

SÉRIE A, N° 326

N° D'ORDRE : 350

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Baruch Samuel LEVIN

Né le 3 avril 1905, à Vilna

1^{re} THÈSE. — Action des lipoides sur les phénomènes de la lyse.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1936, devant la Commission d'examen

Président : M. PORTIER.

Examineurs : { M. PRENANT.
M. F. PERRIN.

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1936



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546312_0020

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Baruch Samuel LEVIN

Né le 3 avril 1905, à Vilna

1^{re} THÈSE. — Action des lipoides sur les phénomènes de la lyse.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1936, devant la Commission d'examen

Président : M. PORTIER.

Examineurs : { M. PRENANT.
M. F. PERRIN.

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS

6, rue de la Sorbonne

1936

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

<i>Professeurs honoraires</i>	H. LE CHATELIER.	LÉON BRILLOUIN.	AUGER.
	H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
	A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
	A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
	EMILE PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
	Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.
			VESSIOT.

PROFESSEURS

G. BERTRAND . . . T	Chimie biologique.	L. JOLEAUD	Paléontologie.
M. CAULLERY . . . T	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	ROBERT-LÉVY . . .	Zoologie.
G. URBAIN T	Chimie générale.	F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Emile BOREL . . . T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	Henri VILLAT . . . T	Mécanique des fluides et applications.
Jean PERRIN . . . T	Chimie physique.	Ch. JACOB T	Géologie.
H. ABRAHAM . . . T	Physique.	P. PASCAL T	Chimie minérale.
E. CARTAN T	Géométrie supérieure.	M. FRÉCHET T	Calcul différentiel et calcul intégral.
M. MOLLIARD . . . T	Physiologie végétale.	E. ESCLANGON . . . T	Astronomie.
L. LAPICQUE . . . T	Physiologie générale.	M ^{me} RAMART-LUCAS . T	Chimie organique.
A. COTTON T	Recherches Physiques.	H. BÉGHIN T	Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
Charles FABRY . . T	Enseignement de Physique.	PAUTHENIER	Physique (P. C. B.).
Charles PÉREZ . . T	Zoologie.	De BROGLIE T	Théories physiques.
Léon BERTRAND . T	Géologie structurale et géologie appliquée.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
P. PORTIER T	Physiologie comparée.	P. JOB	Chimie générale.
E. RABAUD T	Biologie expérimentale.	LABROUSTE	Physique du Globe.
M. GUICHARD . . .	Chimie minérale.	PRENANT	Zoologie.
Paul MONTEL . . . T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
P. WINTREBERT . T	Anatomie et histologie comparées.	BOHN	Zoologie (P. C. B.).
L. BLARINGHEM . T	Botanique.	COMBES	Botanique.
O. DUBOSCQ . . . T	Biologie maritime.	GARNIER T	Mathématiques générales.
G. JULIA T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	PÉRÈS	Mécanique théorique des fluides.
C. MAUGUIN . . . T	Minéralogie.	HACKSPILL	Chimie (P. C. B.).
A. MICHEL-LÉVY . T	Pétrographie.	LAUGIER	Physiologie générale.
H. BÉNARD T	Mécanique expérimentale des fluides.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique.
A. DENJOY T	Application de l'analyse à la Géométrie.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
L. LUTAUD T	Géographie physique et géologie dynamique	G. RIBAUD T	Hautes températures.
Eugène BLOCH . . T	Physique théorique et physique céleste.	CHAZY T	Mécanique rationnelle.
G. BRUHAT	Physique.	GAULT	Chimie (P. C. B.).
E. DARMOIS	Enseignement de Physique.	CROZE	Recherches. Physiques.
A. DEBIERNE . . . T	Physique Générale et Radioactivité.	DUPONT T	Théories chimiques.
A. DUFOUR T	Physique (P. C. B.).	LANQUINE	Géologie.
L. DUNOYER	Optique appliquée.	VALIRON	Mathématiques générales.
A. GUILLIERMOND T	Botanique.	BARRABÉ	Géologie structurale et géologie appliquée.
M. JAVILLIER . . .	Chimie biologique.	MILLOT	Zoologie (P. C. B.).
		F. PERRIN	Théories physiques.
		VAVON	Chimie organique.
		G. DARMOIS	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire . . . D. TOMBECK.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

D^r SHMARJA LEVIN

A M. LE PROFESSEUR PORTIER

*Qui a bien voulu accepter la présidence de cette
thèse.*

Hommage respectueux.

AVANT-PROPOS

Ce travail, résultat de cinq ans de recherches, n'a été possible que grâce à la bienveillance de M. le Professeur CHAMPY, Professeur d'Histologie à la Faculté de Médecine, de M. le Professeur STROHL, Professeur de Physique Médicale, et de M. DOGNON, Professeur agrégé à la Faculté de Médecine, qui ont bien voulu m'accorder, pendant cette période, l'hospitalité et les ressources de leurs laboratoires.

Je leur adresse ici mes plus respectueux remerciements.

Je voudrais, de même, témoigner ma gratitude à MM. les D^{rs} LOMINSKI, MAGAT, PIFFAULT ET ROGOZINSKI qui ont bien voulu m'accorder une collaboration sans laquelle ce travail n'aurait pu être mené à bonne fin.



L'influence des lécithines sur l'action cytolysante des saponines.

L y a plus de 30 ans que le problème de l'action de la lécithine et de la cholestérine sur le pouvoir hémolysant des saponines a été posé. En ce qui concerne la cholestérine, l'action inhibitrice de celle-ci vis-à-vis de l'hémolyse provoquée par les saponines a été maintes fois vérifiée depuis le travail classique de RANSOM (1). Mais si on analyse la nombreuse littérature concernant l'action de la lécithine, on trouve de grandes divergences d'opinion et un désaccord profond entre les résultats obtenus par des différents auteurs.

RANSOM pense que l'action de la cholestérine est spécifique et que la lécithine, dépourvue d'action, se comporte comme un corps inerte. On trouve dans le travail original de RANSOM l'indication suivante pour la préparation des émulsions de cholestérine qu'il a employées: « J'ai pris un peu de cholestérine pure et je l'ai émulsionnée dans la lécithine. » Il en résulte que toute l'expérimentation de RANSOM a été faite avec des mélanges de cholestérine-lécithine et que beaucoup d'auteurs, se basant sur ces expériences, ont attribué à tort les propriétés de ce mélange à la cholestérine seule.

De même, NOGUCHI (2) trouve que la lécithine ne neutralise pas l'action lytique de la saponine et est dépourvue d'action. KYES (3) trouve qu'elle a des propriétés hémolysantes. D'autre part, ARRHÉNIUS (4) trouve que la lécithine réduit de 50 pour 100 environ l'hémo-

(1) RANSOM, *Deutsche Med. Woch.*, 1901, p. 194.

(2) NOGUCHI, *Journ. of experimental Med.*, 1906, t. 8, p. 1.

(3) KYES, *Berl. Klin. Wochenschrift*, 1903, nos 42 et 43.

(4) ARRHÉNIUS, *Ergebnisse der Physiologie*, 1908, t. 7, p. 480.

lyse en présence des grandes quantités de saponine, mais augmente l'action hémolytique en présence de petites doses de saponines. De même S. BERNARD (1) qui expérimentait avec des solutions alcooliques de lécithine, constate aussi une légère inhibition de l'hémolyse. Mais à part de rares auteurs la presque totalité de savants admet encore aujourd'hui, que contrairement à l'action inhibitrice de la cholestérine, la lécithine diminue la perméabilité des membranes et active l'hémolyse. On parle donc dans des Traités de Pharmacologie de KOFFLER, et dans le Traité de KOLLE-WASSERMANN d'une action antagoniste entre la lécithine et la cholestérine, en ce qui concerne l'action de cette substance sur l'hémolyse, en indiquant que la cholestérine inhibe et la lécithine augmente toujours l'action lytique de la saponine. Dans les expériences, au contraire, nous avons pu constater, que la lécithine diminuait l'action lytique de la saponine pour les concentrations de saponine exerçant encore un effet lytique appréciable, et que seuls des mélanges de cholestérine-lécithine dans des cas tout à fait spéciaux augmentaient l'effet lytique de la saponine.

Nous nous sommes servi, dans nos expériences, de cultures pures, faites à partir d'un seul individu du *Paramaecium Aurelia*, cultivé sur l'extrait de laitue en présence de bactéries. Des saponines commerciales qui, fraîchement préparées, tuent les Paramécies en 10 à 15 minutes à la dilution au 1/10.000^e ont été employées. D'ailleurs la résistance des différentes espèces de Paramécies vis-à-vis de l'action lytique de la saponine pouvait varier du simple au double ; il est donc indispensable de faire ce genre de recherches avec des cultures provenant d'un seul individu.

Les Paramécies étaient de grandeur moyenne et montraient une résistance normale vis-à-vis de l'acide arsénieux. Elles pouvaient supporter indéfiniment une dose de 0,6 pour 100 d'une solution N/10^e d'acide arsénieux, et ne pouvait pas, normalement, supporter indéfiniment une dose de saponines au 1/20.000^e sur lame creusée. En ajoutant de la saponine au 1/5.000^e aux Paramécies normales, on pouvait observer les phénomènes suivants : Les Paramécies faisaient des mouvements rotatoires anormaux en tournant autour de leur axe. Après quelques secondes on constatait une structure alvéolaire typique, un mouvement rapide de granulations réfringentes des

(1) BERNARD, C. R. de la Soc. de Biol.; 1923, t. 189, p. 225.

gouttelettes qui s'agrandissaient rapidement, pour être souvent expulsées. Bientôt arrivait le stade de la vacuolisation du protoplasme, et enfin, on constatait une rupture de la pellicule et le protoplasme s'écoulait au dehors. Après encore quelques minutes, les Paramécies n'avaient rien gardé de leur structure primitive et, quelques heures plus tard, elles étaient entièrement lysées. Nous avons remarqué que les battements des cils vibratiles continuaient longtemps, même lorsque les animaux étaient déjà immobiles et très déformés.

Le comportement des Paramécies mises dans un mélange de saponines et de lécithines était bien différent. Après une courte période d'excitation, accompagnée des mouvements de va-et-vient non coordonnés, les animaux retrouvaient des mouvements normaux et mouraient beaucoup plus tardivement que les témoins ; les Paramécies lécithlinées se déformaient peu, gardaient beaucoup mieux leur structure cellulaire et étaient difficilement lysées.

Après avoir constaté que des émulsions de cholestérine, de plusieurs lécithines commerciales provenant du jaune d'œuf, et un échantillon de phytolécithine, provenant du Soja et exempte de cholestérine et de matières grasses, avaient, en mélange avec les saponines une action inhibitrice sur la cytolyse, nous avons expérimenté avec la lécithine colloïdale.

En présence de la lécithine, des quantités plus ou moins grandes de l'oxygène dissous dans l'eau influencent beaucoup l'action cytolytique de la saponine. Nous avons donc obtenu 2 séries de résultats : une série d'expériences a été faite dans des conditions d'une aération abondante et la deuxième série dans des conditions d'une aération relativement restreinte. Voici, à titre d'exemple, une expérience accomplie dans des circonstances d'une aération normale :

Expérience a. — On prépare 97 cc. d'une solution de saponine au 1/1.000^e et on ajoute 3 cc. d'eau de source. Cette solution témoin sera désignée comme solution A ; à une autre solution de saponine au 1/1.000^e on ajoute de même 3 pour 100 d'une solution de lécithine colloïdale à 10 pour 100. Nous appellerons cette solution d'épreuve solution B.

On ajoute à 2 tubes à hémolyse, contenant chacun 2 cc. d'une culture des Paramécies 0,3 cc. de la solution A (témoin), et à deux autres tubes 0,3 cc. de la solution B (animaux d'expérience). On

ajoute les solutions A et B, en agitant fortement, et en prenant soin d'ajouter les deux solutions dans un même délai de temps.

On fait rapidement la répartition du contenu des tubes dans plusieurs lames creusées, et on note le temps de survie des Paramécies lécithinées et non lécithinées.

Ajoutons que nous nous sommes servis pour cette série d'expériences d'un mélange de lécithine et saponine préparé 24 heures d'avance, en travaillant avec toutes les précautions d'asepsie. En effet, nous avons remarqué qu'il faut un certain temps pour que l'action désintoxicante de la lécithine sur la saponine puisse se faire.

Durée de l'expérience	Mortalité des Paramécies	
	témoins en solutions saponinées	animaux d'épreuve en solution : lécithine-saponine
4 minutes	50 pour 100	tous vivants
8 minutes	tous morts	tous vivants
30 minutes	—	tous vivants
45 minutes		mouvements ralentis
50 minutes		20 pour 100 morts
60 minutes		50 pour 100 morts
80 minutes		80 pour 100 morts
120 minutes		tous morts

En résumé, on peut constater que les Paramécies se trouvant dans une solution de saponine au 1/7.650^e étaient lysés après 8 minutes. Les Paramécies se trouvant dans une solution de saponine au même titre mais lécithinées survivaient sur lame creusée 2 heures, donc 15 fois plus longtemps. En regardant la courbe de la mortalité des Paramécies témoins on remarque que cette mortalité est néante pendant les premières 45 minutes, que 80 pour 100 de la mortalité survient dans les 35 minutes suivantes et seulement 20 pour 100 dans les dernières 40 minutes. La courbe de la mortalité est donc une courbe classique en S.

Expérience b. — Même disposition que l'expérience *a*, mais nous avons ajouté 0,5 cc. de la solution A et B. La solution terminale de saponine était donc 1/5.000^e.

Durée de l'expérience	Témoins	Animaux d'épreuve
3 minutes	tous morts	tous vivants
60 minutes	—	tous vivants
80 minutes	—	tous vivants
100 minutes	—	50 pour 100 morts
110 minutes	—	tous morts

La survie des Paramécies se trouvant dans les solutions lécithinées était donc environ 35 fois supérieure.

Expérience c. — Même disposition que l'expérience *a*, mais 0,7 cc. de la solution A et B ont été ajoutés. La solution terminale de saponine était donc 1/3.850^e.

Durée de l'expérience	Témoins	Animaux d'épreuve
1 minute 30 sec.	tous morts	tous vivants
40 minutes	—	tous vivants
50 minutes	—	15 pour 100 morts
		mouvements ralentis.
60 minutes	—	50 pour 100 morts
70 minutes	—	80 pour 100 morts
90 minutes	—	tous morts

Les Paramécies se trouvant dans la solution lécithinée survivaient donc 60 fois plus longtemps que les animaux témoins.

Expérience d. — Même disposition que l'expérience *a*, mais nous avons ajouté 1 cc. de la solution A et B. La solution terminale de saponine était donc 1/3.000^e.

Durée de l'expérience	Témoins	Animaux d'épreuve
30 secondes	tous morts	tous vivants
60 minutes	—	tous vivants
80 minutes	—	50 pour 100 morts
95 minutes	—	tous morts

Le relation : temps de survie : animaux témoins et animaux d'épreuve, était donc environ 1/2.00^e.

Expérience e. — Même disposition que l'expérience *a*, mais nous avons ajouté 2 cc. de la solution A et B. La solution terminale de saponine était donc 1/2.000^e.

Durée de l'expérience	Témoins	Animaux d'épreuve
35 minutes	mort immédiate	tous vivants
40 minutes	—	mouvements tr. ralentis
50 minutes	—	50 pour 100 morts
60 minutes	—	80 pour 100 morts
65 minutes	—	tous morts

Expérience f. — Cette expérience a été entreprise dans les mêmes conditions que les expériences précédentes mais une dilution de saponine de 1/800^e a été utilisée. Les animaux témoins ont été immédiatement lysés, tandis que les animaux en solution lécithinée succombaient après 9 minutes seulement. En continuant ces expériences avec des solutions de saponine de plus en plus concentrées, l'écart entre la survie des animaux témoins et des animaux d'épreuve diminuait très rapidement, et avec une solution de saponine au 1/300^e les animaux contenus dans les solutions lécithinées succombaient aussi rapidement que les animaux témoins. En augmentant le pourcentage de lécithine on pouvait de nouveau constater une légère augmentation de survie avec des dilutions de saponine au 1/200^e. Mais pour des dilutions plus concentrées en saponine l'addition supplémentaire des lécithines restait inefficace.

En comparant les résultats de ces expériences, on est frappé de voir que la courbe de l'action toxique de sapo-lécithines en fonction du pourcentage de saponine n'est pas toujours progressive. Nous avons constaté que l'action toxique d'une saponine est, à quelques variations légères près, toujours plus active au fur et à mesure que la concentration de la saponine devient plus importante. Mais nous voyons que la durée de survie des Paramécies dans une solution de sapo-lécithines au 1/3.000^e était légèrement plus élevée que dans une solution au 1/3.850^e. Ayant rencontré ce fait de nombreuses fois, aussi bien pour l'action inhibitrice de la lécithine sur l'action lytique du bactériophage que pour l'action anti-lytique de la lécithine vis-à-vis des rayons X, nous sommes inclinés à ne pas chercher l'explication de ce phénomène dans une faute d'expérimentation. On peut donc penser soit à un point de saturation qui ne permet pas à la lécithine d'agir plus activement, soit que la lécithine dans un état colloïdal plus dispersé aura des propriétés antilytiques plus grandes. Une autre hypothèse de travail serait la suivante : nous avons remarqué

que d'une façon analogue à l'action du venin de Cobra qui forme suivant les travaux de DELEZENNE et FOURNEAU une lysocytine, la saponine en petites doses augmente l'action lytique propre à la lécithine. On peut donc envisager que la saponine agit sur les lécithines en excès en les dégradant et nous arriverons ainsi à une deuxième Noxa qui, s'ajoutant à la première produite par la saponine, rendrait impossible un accroissement plus élevé de la survie. Toutefois l'explication de ce phénomène exige des recherches supplémentaires que nous sommes en train d'effectuer.

Dans une autre série d'expériences nous n'avons plus, comme dans les expériences précédentes, ajouté les Paramécies dans une solution de sapo-lécithines, mais, au contraire, nous avons cultivé les Paramécies sur un milieu contenant des doses de lécithine variant de $1/100.000^e$ jusqu'à $1/1.000^e$. Tandis que les Paramécies cultivées dans des milieux contenant moins que $1/10.000^e$ de lécithine montraient le plus souvent une augmentation de la résistance vis-à-vis de l'action lytique de la saponine, les Paramécies cultivées dans des concentrations de saponine moins étendues montraient au contraire une sensibilisation marquée. Ainsi par exemple, le temps de survie des Paramécies cultivées sur l'extrait de laitue était de 50 minutes dans une solution de saponine au $1/16.000^e$. Par contre, le temps de survie des Paramécies mises dans une solution de saponine au même titre lécithinée à 3 pour 1.000 était de 16 heures. Mais l'effet était tout différent si les Paramécies étaient cultivées pendant quelques jours sur l'extrait de laitue lécithinée à 3 pour 1.000. Dans ces conditions le temps de survie des Paramécies était de 8 minutes seulement lorsqu'elles étaient mises en contact avec une solution de saponine au $1/16.000^e$.

On peut donc supposer que ce ne sont pas seulement les cholestérines, mais aussi les phosphatides (lécithines) qui ont une certaine affinité pour les glucosides ; car dans des expériences parallèles nous avons également observé que la lécithine diminuait aussi, exactement comme pour les saponines, l'action toxique de la digitaline, de la digitonine, de l'abrine, de l'éphédrine (toxique seulement pour les Paramécies dans des concentrations dépassant le $1/1.000^e$).

On constate une action antagoniste entre l'action de la lécithine en mélange avec la saponine et entre la lécithine qui, dans les milieux de culture, a été résorbée par les Protozoaires. Une première explication serait d'ordre chimique : la lécithine, en mélange avec la

saponine, formerait un corps nouveau, la sapo-lécithine, qui aurait des propriétés toxiques moins considérables. La sensibilisation pourrait être expliquée par l'affinité de la saponine pour la lécithine qui arracherait du corps de la Paramécie la lécithine, et la tuerait ainsi.

Suivant cette hypothèse la lécithine agirait donc aussi bien comme agent neutralisant que comme ambocepteur. Mais nous pensons que cette hypothèse n'explique pas encore le phénomène entier et qu'il faudra chercher une action adjuvante.

Nous démontrerons dans un autre chapitre que l'action hémolytique des rayons X est inhibée par des injections soit de la lécithine, soit de la cholestérine, mais que des mélanges de ces deux substances en proportions voulues peuvent rendre le sang moins résistant et provoquer une sensibilisation.

La lécithine, absorbée par les cellules, est certainement modifiée et mise en contact avec la cholestérine. Puisque ces deux substances ont ensemble une action qui augmente plutôt la perméabilité des membranes animales, la sensibilisation rencontrée dans les cas mentionnés faciliterait l'explication.

CHAPITRE II

L'influence de l'oxygène sur les sapo-lécithines.

Nous avons montré dans les chapitres précédents que, contrairement à l'opinion classique, les sapo-lécithines ont, dans certaines conditions, un pouvoir cytolytique moins élevé que les saponines seules.

Nous avons déjà démontré que la courbe de l'action toxique de sapo-lécithines en fonction du pourcentage de saponines n'est pas toujours progressive. Dans une autre série d'expériences nous avons remarqué que les sapolécithines ne possèdent pas de propriétés toxiques fixes et que celles-ci sont au contraire sous la dépendance d'un troisième facteur.

Si nous ajoutons à une culture des Paramécies une quantité donnée d'une saponine on peut remarquer que la même concentration en saponine tuera les Paramécies rapidement, si celles-ci sont cultivées dans des récipients à larges ouvertures, et en couches très minces. Au contraire des Paramécies cultivées dans des tubes très étroits, où l'aération est moins parfaite que dans le cas précédent, survivent quelques instants de plus. Ceci est vrai, si le tube contenant les cultures de Paramécies a été laissé au repos pendant un temps suffisant de façon que les Paramécies, par leur respiration, pouvaient appauvrir le pourcentage de l'oxygène contenu dans l'eau. Ce phénomène se produisait plus rapidement si on couvrait l'eau avec une couche d'huile de paraffine ou si on faisait le vide dans le tube. Le même phénomène avait lieu si des cultures des Paramécies étalées en couches minces avaient été mises dans de larges récipients hermétiquement fermés, où le vide a été établi par une pompe à vide monéculaire. Nous donnons ici à titre d'exemple une expérience :

Une solution de saponine au 1/12.000^e tue les Paramécies cultivées dans des conditions d'une aération parfaite en 30 minutes ;

d'autre part dans un tube de Thounberg, séparé en deux compartiments par une paroi en verre, on pose d'un côté 20 cc. d'une culture de Paramécies et de l'autre côté 20 cc. d'une solution de saponine au 1/6.000^e. On fait le vide ; après avoir, par l'inclinaison du tube, versé la solution de saponine dans la culture contenant les Paramécies, on constate que dans ce cas d'une aération restreinte la survie des Paramécies peut atteindre 50 minutes. Nous avons d'ailleurs observé qu'une culture des Paramécies restait vivante pendant plusieurs jours dans un tube à essai scellé. Le terme « aération restreinte » ne signifie donc pas un véritable manque d'oxygène pour les Paramécies, mais simplement une aération où l'oxygène se trouve en quantité diminuée.

Après avoir déterminé que d'autres facteurs, comme la tension de surfaces, n'intervenaient pas dans ce phénomène, nous pouvons donc dire que la toxicité d'une saponine en fonction de la dose est en rapport inverse à la teneur du milieu en oxygène.

Au cours de nos expériences nous avons remarqué que cette propriété de saponines est encore plus marquée pour les sapo-lécithines. Ainsi l'action cytolysante d'une saponine est déjà affaiblie par la lécithine dans le cas d'une aération abondante ; mais c'est seulement dans le cas d'une aération relativement restreinte que la même dose de lécithine peut complètement inhiber l'action de la saponine à un tel point qu'une dose de lécithine tuant les Paramécies dans des conditions d'une aération abondante en moins d'une heure ne les tue plus et permet une culture riche qui a pu être suivie pendant 40 jours.

Pour titrer le degré de toxicité de nos sapo-lécithines, nous nous sommes servis de cultures très riches de *Paramecium aurelia*, faites à partir d'un seul individu. Une échelle allant d'une aération abondante à une aération restreinte était simplement établie en mettant le liquide contenant les animaux d'épreuve soit dans des tubes d'un diamètre variable, soit en couches minces sur lames creusées. On a pris soin de ne pas agiter les tubes pendant la durée des expériences et on a seulement prélevé de temps en temps quelques gouttes à l'aide d'une pipette Pasteur pour examiner l'état de la culture.

Voici quelques expériences :

Expérience I. — Deux tubes à hémolyse contenant 1,5 cc. d'une culture des Paramécies ont été additionnés de 0,5 cc. d'une solution

de sapo-lécithine afin d'obtenir dans les tubes une concentration de $1/8.000^e$ de saponine et de $1/2.500^e$ de lécithine par rapport au poids sec. Deux tubes témoins ne contenaient pas de lécithine.

	Temps de survie
Témoin N° 1 sur lame creusée	8 minutes
Animaux d'épreuve sur lames creusées	60 minutes
Témoin N° 2 en tube	9 minutes
Animaux d'épreuve N° 2 en tube	72 heures dont 48 heures culture normale devenant après de plus en plus rare

Dans le cas d'une aération abondante (lames creusées) l'addition de la lécithine permettait donc une augmentation de survie dans la proportion de 7,5 à 1, alors que dans le cas d'une aération restreinte (tubes) les Paramécies vivaient 540 fois plus longtemps.

Expérience II. — Six tubes à essais contenant chacun 9 cc. d'une solution de saponine à 1 pour 1.000 dans de l'eau de source ont été additionnés de 1 cc. de solution de lécithine, afin d'obtenir dans les tubes des concentrations suivantes : 1 pour 20.000 ; 1 pour 2.000 ; 1 pour 1.000 ; 1 pour 500 ; 1 pour 250 ; 1 pour 125 par rapport au poids sec.

Durée de la survie	Tubes n° 1 à 6					
	1 (1 p. 120.000)	2 (1 p. 12.000)	3 (1 p. 6.000)	4 (1 p. 3.000)	5 (1 p. 1.500)	6 (1 p. 600)
9 minutes	tous morts	mourants	vivants	vivants	vivants	vivants
40 minutes		tous morts	»	»	»	»
10 heures			50 p. 100 morts	»	»	»
2 jours			tous morts	50 p. 100 morts	»	»
3 jours				tous morts	nombreux survivants	»
4 jours					rare survivants	rare survivants
5 jours					tous morts	rare survivants
6 jours						tous morts

Ces solutions ont été laissées au repos pendant 24 heures à la température ambiante, puis 2 cc. de chaque tube ont été ajoutés goutte par goutte à 6 autres tubes (n°s 1-6) contenant 10 cc. d'une culture de Paramécies. Par cette manipulation la lécithine a été encore 6 fois

diluée et les tubes contenaient donc maintenant des solutions à concentrations croissantes de 1/120.000^e à 1/600^e de lécithine, et tous contenaient 1 pour 6.000 de saponine. Trois tubes témoins ne contenaient pas de lécithine.

La durée de survie des témoins était de 9 minutes. La durée de survie des Paramécies, dans les mêmes conditions que dans le tube n° 4, mais sur lame creusée, était de 90 minutes au lieu de 48 heures dans le tube à essai. Nous constatons donc que, dans un cas donné, la lécithine augmentait la survie de nos Paramécies de 10 fois. Mais dans des conditions d'une aération relativement restreinte la survie des animaux dans une solution de sapo-lécithine était de 1.000 fois supérieure à la survie des animaux témoins se trouvant dans une solution de saponine au même taux.

Expérience III. — Cette expérience a été entreprise dans les mêmes conditions que la précédente et avec les mêmes concentrations de lécithine ; seul le taux de saponine a été réduit de moitié (1 pour 12.000).

Durée de la survie	Tubes n ^{os}					
	1	2	3	4	5	6
50 minutes	tous morts	vivants	vivants	vivants	vivants	vivants
1 jour		c. rare	»	»	»	»
3 jours		tous morts	»	»	»	»
4 jours			c. riche n.	c. moy. x.	c. moy.	» x.
5 jours			c. riche n.	c. riche	» x.	rares survi- vants
6 jours			» n.	» n.	rares survi- vants x.	
10 jours			» n.	» n.	tous morts	
20 jours			» n.	» n.		
40 jours			» n.	» n.		

c. = culture ; n. = normal ; x. = animaux noirâtres à mouvements ralentis.

Les animaux de trois tubes témoins sont morts en moins de 50 minutes. Il résulte donc de cette expérience qu'avec une aération restreinte la lécithine à 1 pour 6.000 a inhibé complètement l'action de la saponine à 1 pour 12.000, et que la survie de Paramécies dans une telle solution de sapo-lécithines est illimitée.

Nous avons constaté déjà que les Paramécies cultivées dans un milieu lécithiné peuvent se charger à un tel point de ces produits

qu'elles changent l'opacité et acquièrent, vus dans le microscope par transparence, un aspect noirâtre. Mais ce phénomène devient seulement visible en présence de sapo-lécithines avec une dose de lécithine plus élevée. Il semble qu'une des relations de lécithine-sapnine les plus favorables est celle qui permet un développement de la culture sans changer l'index de la réfraction du Protozoaire et qu'avec cette relation la survie atteint un maximum.

En résumé nous avons montré que la toxicité d'une sapo-lécithine donnée est fortement influencée par la présence de l'oxygène.

CHAPITRE III

L'influence de l'oxygène sur l'action antitoxique de la cholestérine sur les saponines.

RANSOM qui, le premier, avait démontré que la cholestérine peut atténuer ou même inhiber l'action lytique de la saponine, attribuait à la cholestérine des propriétés antilytiques fixes. Depuis, de nombreux auteurs, partant de l'hypothèse qu'une quantité donnée de cholestérine pourrait toujours inhiber une même quantité d'une saponine donnée, quelles que soient les conditions dans lesquelles les expériences ont été établies, avaient essayé d'établir des réactions biologiques basées sur le pouvoir antilytique d'un sérum à examiner.

Dans nos recherches sur le pouvoir antilytique des lécithines nous avons remarqué que la toxicité d'une sapolécithine était sous la dépendance de la richesse du milieu en oxygène. Nous avons voulu nous rendre compte si l'oxygène jouait le même rôle en ce qui concerne l'action lytique des sapo-cholestérines.

La presque totalité des auteurs s'occupant du problème de l'action antilytique de la cholestérine ont travaillé avec une méthode hématologique, en se servant comme test du sang des mammifères. Mais les travaux de WARBURG ont montré que la respiration des hématies de mammifères est infiniment petite, et que la quantité d'oxygène dissous dans une quantité de sérum reste pendant des heures constante.

Pour nos expériences, au contraire, il fallait créer des conditions d'aération variables entre de larges limites. Nous avons donc choisi comme animaux d'expériences les *Paramécies* pour les raisons suivantes : pour créer des conditions d'une aération restreinte, il suffit de cultiver les *Paramécies* dans des tubes à essais de faible diamètre. Si on prend soin d'éviter l'agitation des tubes, les animaux consomment en peu de temps une quantité importante d'oxygène qui est seulement lentement remplacée à cause de la faible surface de

l'eau en contact avec l'air. D'autre part, en plaçant les Paramécies sur des lames creusées et en plaçant celles-ci dans des chambres humides pour éviter l'évaporation, l'oxygène du milieu est sans cesse renouvelé.

Ayant remarqué que l'action antilytique de la cholestérine était aussi sous la dépendance du pH du milieu nous avons constamment pris des mesures de ce facteur. Il était inutile d'avoir recours aux solutions-tampons, puisque nous nous sommes aperçus que les Paramécies possèdent un assez grand pouvoir d'autorégulation du pH. Enfin, contrairement aux méthodes hématologiques, on peut suivre le résultat des expériences pendant plusieurs semaines.

Nous nous sommes servis pour l'expérimentation de cultures pures de *Paramaecium aurelia* faites à partir d'un seul individu et cultivées sur l'extrait de laitue. En ajoutant, par exemple, une dose de saponine au 1/4.000^e aux Paramécies conservées sur lames creusées, on constatait aussitôt la rupture de la pellicule et les animaux mouraient en quelques instants, entièrement lysés. Le comportement des Paramécies dans un mélange de saponine-cholestérine était bien différent. Pendant plusieurs heures les animaux ne pouvaient être distingués des Infusoires normaux, ils mouraient beaucoup plus tardivement que les témoins et étaient difficilement lysés. En plaçant les Paramécies dans des tubes de faible diamètre, contenant les mêmes proportions du principe lytique, leur survie était illimitée.

L'émulsion de cholestérine à 1 pour 1.000 employée dans ces expériences a été simplement préparée au moyen d'un agitateur mécanique à billes de verre en présence d'une très petite quantité d'huile d'olive purifiée. L'émulsifiant seul, dans les quantités employées dans ces expériences, n'avait pas d'influence sur la durée de la survie. L'émulsion résultante était stérilisée à 115° pendant 15 minutes.

Expériences : 54 tubes à essais de 10 cc. recevaient par groupe de six, 7 cc. d'une émulsion de cholestérine de concentrations décroissantes de 1/1.000^e-1/32.000^e. 54 tubes témoins recevaient 7 cc. d'eau de source. Tous les tubes étaient additionnés de 1 cc. d'une solution de saponine afin d'obtenir des concentrations de saponine comprises entre 1/1.000^e et 1/32.000^e. On laissait reposer le tout pendant une heure, puis on y ajoutait 2 cc. d'une riche culture de Paramécies. L'expérience a été suivie pendant 3 semaines (Voy. le tableau).

Nos des tubes	Contenu		Durée de survie		
			Témoins	Animaux d'épreuves	
	Cholestérine	Saponine		Sur lame	En tube
1- 6	néant	1/1.000 ^e	10 sec.	—	—
7- 12	1/1.000-1/32.000 ^e	1/1.000 ^e	—	10 sec.	10 sec.
13- 18	néant	1/2.000 ^e	10 sec.	—	—
19	1/1.000 ^e	»	—	13 min.	18 h.
20	1/2.000 ^e	»	—	1 min.	2 h.
21- 24	1/4.000-1/32.000 ^e	»	—	10 sec.	10 sec.
25- 30	néant	1/4.000 ^e	10 sec.	—	—
31	1/1.000 ^e	»	—	40 min.	survie illimitée
32	1/2.000 ^e	»	—	20 min.	3 jours
33	1/4.000 ^e	»	—	5 min.	7 min.
34- 36	1/8.000-1/32.000 ^e	»	—	10 sec.	10 sec.
37- 42	néant	1/6.000 ^e	1 min.	—	—
43	1/1.000 ^e	»	—	6 h.	survie illimitée
44	1/2.000 ^e	»	—	2 h.	id.
45	1/4.000 ^e	»	—	50 min.	id.
46	1/8.000 ^e	»	—	14 min.	2 jours
47	1/16.000 ^e	»	—	5 min.	4 h.
48	1/32.000 ^e	»	—	2 min.	10 min.
49- 54	néant	1/8.000 ^e	90 sec.	—	—
55- 56	1/1.000-1/2.000 ^e	»	—	survie illimitée	survie illimitée
57	1/4.000 ^e	»	—	12 h.	id.
58	1/8.000 ^e	»	—	2 h.	id.
59	1/16.000 ^e	»	—	11 min.	2 jours
60	1/32.000 ^e	»	—	4 min.	5 h.
61- 66	néant	1/12.000 ^e	4 min.	—	—
67- 69	1/1.000-1/4.000 ^e	»	—	survie illimitée	survie illimitée
70	1/8.000 ^e	»	—	16 h.	id.
71	1/16.000 ^e	»	—	3 h.	id.
72	1/32.000 ^e	»	—	1 h.	36 h.
73- 78	néant	1/16.000 ^e	17 min. sur lame	—	—
79- 82	1/1.000-1/8.000 ^e	»	ou	survie illimitée	survie illimitée
83	1/16.000 ^e	»	23 min. en tube	15 h.	id.
84	1/32.000 ^e	»	—	3 h.	id.
85- 90	néant	1/24.000 ^e	3 h. sur lame	—	—
91- 95	1/1.000-1/16.000 ^e	»	ou	survie illimitée	survie illimitée
96	1/32.000 ^e	»	5 h. en tube	2 jours	id.
97-102	néant	1/32.000 ^e	survie illimitée	—	—
103-108	1/1.000-1/32.000 ^e	»	—	survie illimité	survie illimitée
109-115	1/1.000-1/32.000 ^e	néant	survie illimitée	id.	id.

Il résulte de ces expériences que la cholestérine inhibe fortement l'action lytique de la saponine, même dans un cas d'une aération abondante. Mais pour certaines concentrations de saponine-cholestérine le facteur de l'aération exerce sur la durée de survie une influence très importante. La cholestérinisation dans des conditions d'une aération abondante diminue la toxicité de la saponine, mais seulement avec une aération relativement restreinte la toxicité de la saponine devient nulle.

Ces faits nous permettront peut-être de formuler une hypothèse sur une des raisons de l'action antilytique de la cholestérine. Nous voyons (tubes n^{os} 73-78 et 85-90) qu'une saponine réduite devient moins toxique ; la réaction de défense de Paramécies vis-à-vis de la saponine consiste donc dans la réduction de celle-ci en une forme moins toxique analogue aux changements du AsO^3 à la forme moins toxique AsO^5 pour des Paramécies cultivées en présence de l'acide arsénieux. Il va de soi qu'une aération restreinte est plus favorable pour la réduction de la saponine.

CHAPITRE IV

L'action de la lécithine et de la cholestérine en solutions colloïdales sur la coloration vitale.

Depuis que OVERTON a établi sa théorie sur la perméabilité cellulaire et sur le rôle que la membrane lipoïdique de celle-ci joue dans les phénomènes de la perméabilité, un grand nombre de travaux a paru qui, tout en modifiant légèrement ou attaquant la théorie d'OVERTON, a plutôt confirmé que les phosphatides et la cholestérine jouent un rôle prépondérant dans les processus concernant la perméabilité cellulaire.

Nous nous efforçons dans ce livre de démontrer que la résistance de la cellule vis-à-vis des nombreux agents soit chimiques, soit physiques, est profondément influencée par les substances désignées. Pour élucider le mécanisme de ces faits expérimentaux nous avons entrepris les expériences suivantes qui montrent que les lipoides changent sensiblement la perméabilité cellulaire vis-à-vis des colorants vitaux.

Des cultures de *Paramecium caudatum* et de *Paramecium aurelia*, cultivées à partir d'un seul individu, ont été obtenues dans un milieu de culture végétale à base de laitue. Dans une série de 10 tubes contenant 20 cc. d'une culture des Infusoires nous avons ajouté pendant une semaine trois fois par jour I à X gouttes de lécithine colloïdale (solution à 1 pour 100 de la solution mère) ; le tube n° 10 qui avait reçu la plus forte dose de lécithine avait donc reçu 0,006 gr. du produit sec. Dix autres tubes servaient, comme témoins.

Déjà, après 24 heures, on pouvait noter que les cultures des Paramécies ayant reçu la lécithine colloïdale, se multipliaient beaucoup plus rapidement que les cultures témoins, à un tel degré que plusieurs centaines des Infusoires étaient contenus dans une goutte d'eau contre 10 à 30 individus dans les cultures témoins. Après 48 heures, les Paramécies cultivées dans le milieu lécithiné étaient d'une colora-

tion plus foncée et avaient un aspect bleu noirâtre. Ce phénomène qui se montrait tout d'abord dans les tubes les plus chargés de lécithine, s'est généralisé après quelques jours dans les autres tubes sauf toutefois dans les tubes n^{os} 1 et 2, où les Paramécies restaient aussi translucides que les témoins. Dans les tubes 8, 9 et 10 les Paramécies lécithinées montraient des mouvements ralentis et de même la culture devenait de moins en moins dense.

Nous avons titré la dose minima de plusieurs colorants vitaux, (comme le rouge neutre, le vert Janus, le bleu de méthylène, et bien d'autres) qui était nécessaire pour obtenir une coloration vitale bien appréciable. La valeur des dilutions, donnant l'image classique de la coloration vitale était, suivant le colorant employé, de $1/100.000^e$ à $1/1.000.000^e$, et les vacuoles étaient colorées après 20 minutes jusqu'à 2 heures.

Le premier jour les Infusoires cultivés sur milieu lécithiné prenaient la coloration vitale avec la même rapidité que les animaux témoins. Mais déjà le deuxième jour ils retardaient en comparaison avec les témoins et se coloraient seulement après 4 heures pour montrer alors le même aspect de la coloration. Après 3 jours pour les Paramécies cultivées dans les tubes n^{os} 5 à 10 et après 4 jours pour les Paramécies cultivées dans les tubes n^{os} 2 à 4, la résistance vis-à-vis de la coloration vitale était encore augmentée et ces Paramécies additionnées de rouge neutre pour obtenir une concentration au $1/1.000.000^e$ ne montraient plus aucune coloration. Il a fallu mettre les Paramécies dans une solution de rouge neutre au $1/200.000^e$, donc 5 fois plus concentrée pour avoir le même effet de coloration que pour les Infusoires témoins, colorés au $1/1.000.000^e$. Après une semaine de culture sur milieu lécithiné il a fallu ajouter pour quelques échantillons 25 fois plus de colorants que pour les Paramécies témoins pour avoir une coloration identique. Cette propriété de résistance vis-à-vis du colorant pouvait persister encore, en diminuant lentement, pendant plusieurs jours, après les dernières applications de lécithine.

Il est intéressant de noter que cette résistance vis-à-vis de la pénétration de colorants montrait quand même un seuil assez net et il nous a été impossible de dépasser suivant le colorant des concentrations de $1/10.000^e$ à $1/100.000^e$ pour avoir le même degré de coloration pour les animaux lécithinés et pour les témoins.

Nous pensons que cette résistance vis-à-vis de la coloration vitale

est dans sa meilleure partie due à des processus que l'on peut rapporter à la perméabilité pour les raisons suivantes : le pouvoir réducteur des Paramécies, titré par des indicateurs du rH, est plus lent, d'autre part le phénomène restait sensiblement le même dans des conditions d'une aération restreinte, plus favorable à une oxydo-réduction accélérée.

Dans une autre série d'expériences, nous avons essayé d'éliminer autant que possible la lécithine libre du milieu de culture par ces centrifugations répétées qui laissaient la lécithine en suspension mais accumulaient les Paramécies au fond du tube. Nous avons aussi appliqué le procédé suivant, pour éviter l'action nocive de la centrifugation : les Paramécies ont une tendance à s'accumuler dans des tubes capillaires. Par plusieurs lavages avec des milieux de culture non lécithinés on arrivait à des dilutions telles de la lécithine qu'il paraît invraisemblable que les petites quantités du lipoïde restées après les derniers lavages pussent encore exercer une forte action. Néanmoins ces Paramécies lavées montraient encore une grande résistance vis-à-vis de la pénétration des colorants.

Une même série d'expériences a été faite avec des Paramécies cultivées sur milieu contenant de la cholestérine finement dispersée. Les résultats ont été identiques à l'expérience sus-citée.

Mais le même cas ne se présentait pas si les Paramécies ont été cultivées dans des milieux contenant de la lécithine et de la cholestérine à parties égales, puisque l'effet sur la perméabilité des Paramécies du mélange de ces deux substances était le plus souvent moins marqué que l'action de chacun de ses constituants.

CHAPITRE V

Recherches comparées de quelques échantillons de phyto- et ovo-lécithines ; leur action sur l'hémolyse.

I

Le problème, très complexe, de l'action des lécithines sur le pouvoir hémolysant des saponines, étudié à plusieurs reprises depuis 30 ans, n'a pas été définitivement résolu jusqu'ici. Nous attribuons ce fait aux raisons suivantes :

1^o La lyse des hématies par les saponines est d'autant mieux inhibée par l'action antilytique des lécithines que celles-ci sont émulsionnées plus finement. Il y a donc un grand intérêt à travailler avec des solutions colloïdales de lécithines qui ne sont plus précipitées par une centrifugation prolongée à grande vitesse. La lécithine colloïdale employée dans nos expériences supportait parfaitement une centrifugation pendant 6 heures à 5.000 tours par minute.

2^o Des lécithines impures, préparées en présence de l'air et, par conséquent, oxydées et dégradées, acquièrent un pouvoir hémolysant prononcé.

3^o Les auteurs employant des solutions alcooliques de lécithine constatent une légère inhibition de l'hémolyse ; mais à cause de la toxicité de ces solutions, ce mélange alcoolique ne pouvait être ajouté en proportions suffisantes aux suspensions des hématies, pour atteindre une inhibition très puissante de l'hémolyse.

4^o Les lécithines ont un pouvoir hémolysant propre qui, comme nous l'avons trouvé, passe par un maximum pour une concentration donnée et s'affaiblit de part et d'autre, aussi bien vers les taux plus élevés que vers les concentrations plus faibles.

La lécithine employée avait, pour 100, la composition suivante :

Lécithine du jaune d'œuf, exempte de cholestérine	10
Glycérine purifiée	8
$CaCl^2 + KCl + NaCl + NaHCO^3$	0,6
Eau bidistillée, quantité suffisante pour 100.	

La préparation a été faite autant que possible à l'abri de l'air. Cette solution colloïdale de lécithine à 10 %, par rapport au poids sec était tyndallisée et servait de solution mère. Les dilutions, jusqu'à 1/15.000.000^e, étaient préparées à partir de la solution mère, avec de l'eau isotonique au sang de l'animal choisi pour l'expérience.

Nous avons dans des expériences parallèles remplacé cette lécithine colloïdale par une lécithine purifiée suivant les procédés de I.-P. LÉVINE et nous avons obtenu sensiblement les mêmes résultats.

Plusieurs milliers d'hémolyses ont été effectuées ; nous donnons ici, à titre d'exemple, les résultats d'une expérience. 54 tubes à hémolyse avaient reçu 1 cc. de la solution de la lécithine colloïdale dans l'eau salée, afin d'obtenir des concentrations décroissantes comprises entre 1/40^e et 1/5.000.000^e par rapport au poids sec, avec une raison égale à 2. D'autre part, 18 tubes témoins recevaient 1 cc. d'eau physiologique sans lécithine.

Les tubes nos 1 à 18 et 6 tubes témoins recevaient ensuite 1 cc. d'une solution de saponine purifiée Cogit dans l'eau physiologique à 1/100^e, par rapport au poids sec. Les tubes 19 à 36 et 6 tubes témoins recevaient 1 cc. de la même saponine à 1/1.000^e, et enfin les tubes 37-54 et 6 tubes témoins recevaient 1 cc. de saponine à 1/5.000^e. On a laissé reposer ces solutions pendant 24 heures à la température ambiante ; puis on a ajouté 1 cc. de sang de Mouton, recueilli aseptiquement, 5 fois lavé et 20 fois dilué. Séjour dans la chambre-étuve à 37° pendant 2 heures et lecture des résultats. La lecture des résultats étant rendue difficile dans les tubes contenant de hautes doses de lécithine, par suite de l'opalescence du milieu : on prélevait de temps en temps quelques gouttes et on les examinait dans un compte-globules. Toutes les manipulations ont été faites aseptiquement (V. tableau, p. 23).

En résumé, on constate que le temps nécessaire pour provoquer l'hémolyse complète était 240 fois supérieur pour la première série lécithinée (tubes nos 1 à 18), par rapport aux témoins. Dans la deuxième série (tubes 19 à 36), la relation était même de 1/900^e, pour retomber dans la troisième série (tubes nos 37 à 54) à 1/100^e ;

TABEAU.

N° des tubes	1 cc. de lécithine au		Hémolyse complète après
1	40 ^e	1 cc. de saponine à 1 p. 100	8 min.
2	80 ^e		2 min. 10 sec.
3	160 ^e		20 sec.
4	320 ^e		14 sec.
5	640 ^e		13 sec.
6	1.280 ^e		10 sec.
7 à 10	2.500 ^e - 20.000 ^e		7 sec.
11 à 18	40.000 ^e - 5.000.000 ^e		3 - 2 sec.
Tubes témoins n°s 1 à 6	0		2 sec.
19	40 ^e	1 cc. de saponine à 1 p. 1.000	3 h. 40 min.
20	80 ^e		3 heures
21	160 ^e		2 h. 20 min.
22	320 ^e		1 h. 20 min.
23	640 ^e		6 min.
24	1.280 ^e		9 min.
25	2.560 ^e		1 min. 30 sec.
26	5.000 ^e		1 min.
27 à 33	10.000 ^e - 640.000 ^e		25 sec.
34 à 36	1.280.000 ^e - 5.000.000 ^e		10 sec.
Tubes témoins n°s 7 à 12	0		10 sec.
37 à 39	40 ^e - 160 ^e	1 cc. de saponine à 1 p. 5.000	5 heures
40	320 ^e		4 h. 30 min.
41 à 42	640 ^e - 2.560 ^e		2 h. 30 min.
43	5.000 ^e		2 h. 15 min.
44	10.000 ^e		1 h. 15 min.
45	20.000 ^e		1 heure
46	40.000 ^e		25 min.
47	80.000 ^e		17 min.
48 à 49	160.000 ^e - 320.000 ^e		15 min.
50 à 54	640.000 ^e - 5.000.000 ^e		3 min.
Tubes témoins n°s 13 à 18	0		3 min.

mais, aussi, le début de l'hémolyse était bien plus tardif pour les séries lécithinées. Ainsi, par exemple, dans les tubes 37 à 40, les premiers signes de l'hémolyse se montraient seulement après 2 heures, tandis que les témoins étaient déjà lysés après 3 minutes.

Il résulte donc de ces expériences que l'addition d'une lécithine en solution colloïdale réduit fortement le pouvoir hémolytique de la saponine après une brève période d'attente. La quantité de lécithine ajoutée, par rapport à la saponine, exerce une influence importante dans ce phénomène. Avec les faibles doses de saponine, la lécithine montre encore une action inhibitrice au 1/1.000.000^e ; d'autre part l'hémolyse est presque 1.000 fois retardée avec la lécithine à fortes doses. Ce ne sont donc pas seulement les cholestérines, mais aussi les phosphatides (lécithines) qui ont une certaine affinité avec les saponines, et que le pouvoir anti-hémolytique des lécithines vis-à-vis

des saponines peut, dans certaines conditions, égaler le pouvoir anti-hémolytique des cholestérines.

II

L'action hémolytique des lécithines.

En continuant nos recherches sur l'action des lécithines dans le phénomène de l'hémolyse, nous avons remarqué que l'intensité de l'action lytique des lécithines passe par un maximum pour une concentration donnée et s'affaiblit de part et d'autre, aussi bien vers les taux plus élevés que vers les concentrations plus faibles.

En particulier l'hémolyse était la plus forte, avec un échantillon de phytolécithine de dilution égale à 1 pour 4.800 ; elle était très légère avec des dilutions plus fortes ou plus étendues (tableau I).

On s'est servi d'une phytolécithine fraîchement préparée provenant du soja. Le phosphatide est émulsionné par agitation mécanique pendant 4 heures en présence de petites quantités d'huile de pseudo-amandes douces. L'émulsion mère résultante à 2 pour 100 peut être diluée d'emblée avec de l'eau salée à 8 pour 1.000 sans provoquer de floculation.

Avec un échantillon d'une ovolécithine colloïdale l'hémolyse était forte avec une dilution à 1 pour 9.600 ; avec des dilutions plus fortes ou plus étendues, elle était inexistante au bout de 24 heures.

TABLEAU I. — Tubes contenant 1 cc. de sang dilué 20 fois + 1 cc. d'eau salée à 8 p. 1.000 + 1 cc. de phytolécithine.

Dilution totale de la phytolécithine	Hémolyse après 24 h.
1 p. 150	légère
1 p. 300	légère
1 p. 600	légère
1 p. 1.200	forte
1 p. 2.400	très forte
1 p. 4.800	presque complète
1 p. 9.600	très forte
1 p. 19.800	légère
1 p. 40.000	néant
1 p. 80.000 - 1 p. 15.000.000	néant

L'échantillon de lécithine employée avait, pour 100, la composition suivante :

Lécithine du jaune d'œuf, exempte de cholestérine	10
Glycérine purifiée	8
$CaCl^2 + KCl + NaCl + NaHCO^3$	0,6
Eau bi-distillée, q. s. p. 100	

TABLEAU II. — Tubes contenant 1 cc. de sang dilué 20 fois + 1 cc. d'eau salée à 8 p. 1.000 + 1 cc. d'ovoléctithine.

Dilution totale de la lécithine	Hémolyse après 24 h.
1 p. 300	néant
1 p. 600	néant
1 p. 1.200	néant
1 p. 2.400	très légère
1 p. 4.800	légère
1 p. 9.600	forte
1 p. 19.200	légère
1 p. 40.000	très légère
1 p. 80.000 - 1 p. 15.000.000	néant

Le pH était de 7,3. Toute la préparation avait été faite autant que possible à l'abri de l'air. Les dilutions, jusqu'à 1 pour 15.000.000 étaient préparées à partir de la solution mère à 10 pour 100, avec de l'eau salée à 8 pour 1.000. Le sang provenait du cobaye ; on l'a lavé 4 fois et dilué 20 fois.

Pour l'expérience, les tubes à hémolyse étaient chargés de 1 cc. des solutions de lécithines dans l'eau salée à 8 pour 1.000, afin d'obtenir des concentrations décroissantes comprises entre 1 pour 50 et 1 pour 5.000.000 par rapport au poids sec, avec une raison égale à 2. D'autre part, dans des séries témoins, 1 cc. d'eau salée remplaçait la lécithine. Ensuite, tous les tubes recevaient 1 cc. d'eau salée et 1 cc. de sang de cobaye dilué 20 fois. Séjour à l'étuve à 37° pendant 2 heures et lecture des résultats après 24 heures.

Des expériences supplémentaires ont été entreprises avec des lécithines commerciales (POULENC et MERCK). L'effet lytique de ces deux échantillons étaient tellement marqué que le sang montrait une hémolyse prononcée après quelques minutes de contact avec ces lécithines. Ceci explique en partie le fait que quelques auteurs, travaillant avec des produits soi-disant « purissimum » ne pouvaient pas mettre en évidence le facteur antilytique des lécithines, étant donné que celui-ci était caché par les propriétés hémolytiques prononcées de ces produits impurs et dégradés.

En résumé, nous avons mis en évidence les deux actions inverses de la lécithine : antihémolytique et hémolytique. La première est

très prononcée dans la lécithine relativement purifiée et fraîchement préparée ; elle est très faible dans des lécithines commerciales, vieilles. L'action hémolytique est surtout manifeste dans les lécithines commerciales ; elle s'affaiblit notablement avec le degré de purification. Ces deux facteurs agissant simultanément l'un et l'autre, l'hémolyse se trouve tantôt renforcée, tantôt affaiblie. Ce phénomène explique pourquoi, dans nos expériences (voir les tableaux), le facteur hémolytique était le plus marqué dans les dilutions de 1 pour 4.800 à 1 pour 9.200. Dans les dilutions moins étendues de lécithine, le facteur antilytique l'emportait sur le facteur hémolytique ; dans les dilutions plus étendues, on notait le phénomène inverse ; enfin, dans des dilutions contenant encore moins de lécithine, le facteur hémolytique étant très affaibli, la lyse ne se faisait plus.

III

Inhibition de l'action hémolysante d'une ovolécithine par la saponine.

Le temps nécessaire pour provoquer l'hémolyse complète par une saponine peut être augmenté même dans la proportion de 1 à 1.000 environ, si la saponine, quelques heures avant d'être ajoutée aux globules rouges, est mise en contact avec une lécithine très purifiée.

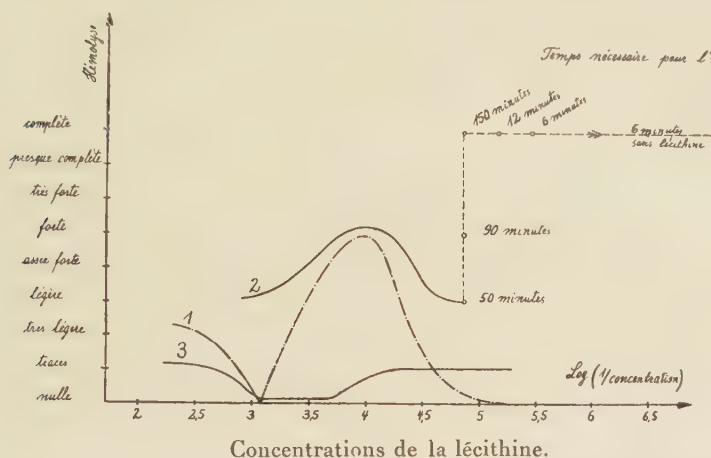
D'autre part, même des lécithines très purifiées possèdent, outre leur action anti-hémolytique, une action hémolytique qui passe par un maximum pour une concentration donnée et s'affaiblit de part et d'autre, aussi bien vers la concentration la plus élevée que vers la plus faible.

On met maintenant en évidence un phénomène de neutralisation qui consiste en ce que, pour certaines dilutions critiques, les mélanges récents de saponine et de lécithine ont une action lytique moins marquée que chacun des constituants.

Rappelons que l'action hémolytique de la saponine, à des concentrations où les lécithines montrent le plus leur action inhibitrice, est très rapide et que, par exemple, une solution de saponine seule à 1 pour 15.000 peut provoquer une lyse complète en environ 3 minutes. L'action lytique de la lécithine est plus lente. Pour étudier l'effet résultant de l'action lytique combinée de la saponine et de la

lécithine, il faut donc choisir des concentrations de ces deux corps qui produisent une hémolyse lente.

La figure ci-jointe traduit l'aspect d'une expérience dans laquelle on a porté en abscisses le logarithme de la valeur réciproque des concentrations d'une ovolécithine colloïdale, possédant une action hémolytique faible, et en ordonnées le degré de l'hémolyse après une



durée de l'expérience de 24 heures. La courbe n° 1 en traits interrompus montre l'effet hémolytique de l'ovolécithine sans saponine. La courbe n° 2 en traits pleins montre la forte action inhibitrice de différentes concentrations de lécithine vis-à-vis de l'action lytique de la saponine diluée à 1 pour 18.000 dans tous les tubes à hémolyse. La courbe n° 3 montre l'effet combiné d'une solution de saponine à 1 pour 120.000, provoquant l'hémolyse complète en 8 à 9 heures, et de différentes concentrations de lécithine. L'action hémolysante de la saponine et l'action hémolysante de la lécithine, au lieu de s'ajouter, se sont réciproquement inhibées, et pour certaines concentrations des deux corps, l'action lytique est devenue négligeable.

Le sang employé provenait du cobaye et était lavé 3 fois et dilué 20 fois. La lécithine était préparée à partir du jaune d'œuf, autant que possible à l'abri de l'air.

Les tubes à hémolyse recevaient : 1° 1 cc. de lécithine colloïdale dans l'eau salée à 8,5 pour 1.000, afin d'obtenir des concentrations décroissantes entre 1 pour 40 et 1 pour 5.000.000, avec une raison égale à 2 ; 2° 1 cc. d'une solution de saponine de quillaya et 3° après

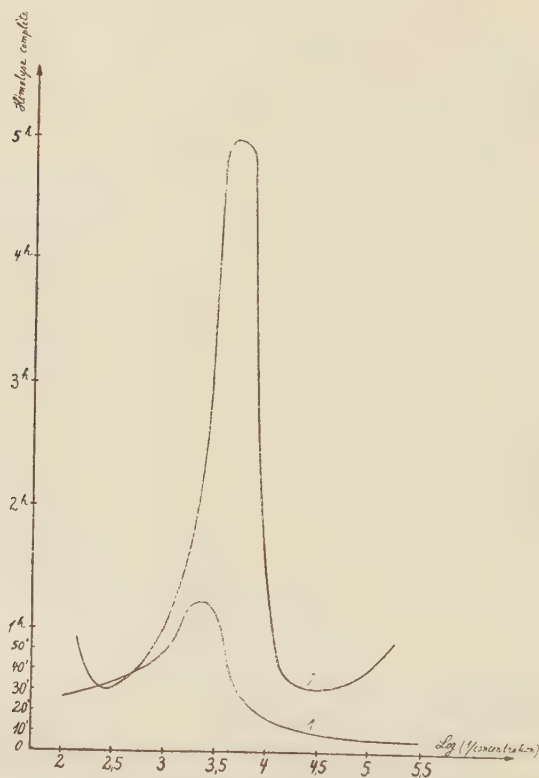
2 heures de contact, 1 cc. de sang. Séjour de 2 heures dans l'étuve à 37°, puis à la température de la chambre.

Il résulte donc que l'action hémolytique d'une solution récente de saponine et de lécithine, agissant ensemble, peut, dans certaines concentrations, devenir plus faible que l'action hémolytique de chacun des deux constituants séparés.

IV

Etude de l'action hémolysante d'un complexe saponine-phytolécithine.

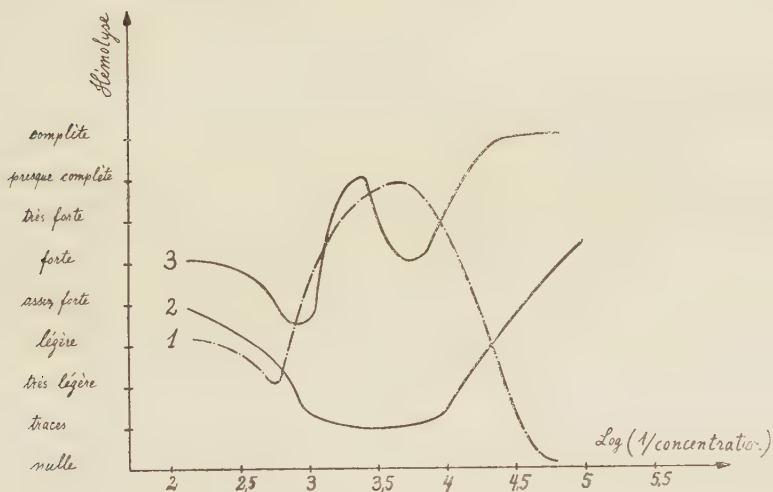
Une ovolécithine très purifiée protège le sang contre l'action lytique de la saponine. Il est à noter que la dose la plus forte de lécithine employée protège le mieux et que la protection diminue lorsqu'on abaisse la concentration de la lécithine.



En reprenant ces recherches avec une phytolécithine, nous avons remarqué que le pouvoir protecteur de la phytolécithine avait son

maximum pour une concentration donnée et s'affaiblissait aussi bien vers le taux le plus élevé en phytolécithine que vers la concentration la plus faible. Ainsi, l'action antilytique de la phytolécithine s'exerçait avec la même intensité vis-à-vis d'une même concentration en saponine pour une dilution au 1/150^e que pour une dilution 64 fois plus étendue.

La figure 1 traduit l'aspect de ce phénomène. On a porté en abscisses le logarithme de la valeur réciproque des concentrations d'une émulsion de phytolécithine et en ordonnées le temps nécessaire pour provoquer l'hémolyse complète. La courbe n° 1 montre que, pour des concentrations de saponine au 1/18.000^e, c'est la dilution de phytolécithine au 1/2.500^e qui inhibe le mieux l'hémolyse. Les témoins non protégés par la lécithine ont été lysés en 6 minutes environ. La courbe n° 2 présente avec une allure encore plus prononcée le même phénomène avec un mélange phytolécithine-saponine diluée au 1/60.000^e. Les témoins chez lesquels on a remplacé la lécithine par l'eau salée ont été lysés en 50 minutes environ.



Dans la figure 2, on a porté en ordonnées les degrés de l'hémolyse pour un temps donné et, en abscisses, le logarithme de la valeur réciproque des concentrations d'une émulsion de phytolécithine. La courbe n° 1, en traits interrompus, montre l'action hémolysante de la phytolécithine après 24 heures de contact avec le sang. Après 6 heures, l'hémolyse était seulement au stade de traces et, après 10 heures, elle était légère. La courbe n° 2, en traits pleins, traduit

l'aspect de l'action hémolysante d'un mélange phytolécithine-saponine diluée au 120.000^e, lecture des résultats après 6 heures, et la courbe n° 3, montre les résultats de la même expérience après une durée de 10 heures. Ajoutons que, chez les tubes témoins, sans lécithine, l'hémolyse était forte après 6 heures, et complète après 10 heures.

L'aspect de ces courbes montre qu'il y a plusieurs effets superposés : 1° la phytolécithine seule, pour la durée de nos expériences (50 minutes jusqu'à 10 heures), avait un pouvoir lytique nul ou faible ; 2° de fortes doses de la substance lytique (saponine) mises en contact avec de fortes doses de substance antilytique (lécithine) montraient, pendant des expériences de brève durée, une inhibition du pouvoir hémolytique plus faible que de fortes doses de la substance lytique mises en contact avec de faibles doses de la substance anti-lytique ; 3° la substance lytique l'inhibe tout d'abord. Mais le pouvoir protecteur s'affaiblit très considérablement avec le temps.

Il nous faut alors poser la question : ces phénomènes dérivent-ils d'une seule et même cause ? Admettons une analogie entre le complexe lécithine-venin de cobra, formant par dégradations de la lécithine, un nouveau corps lytique, la lysocythine (1) et le complexe lécithine-saponine. La lécithine acquiert donc par le contact de la saponine des propriétés hémolytiques plus prononcées, probablement par dégradation.

En faveur de cette hypothèse, on peut citer les faits indiqués au début de cette note, montrant que le pouvoir protecteur de la phytolécithine avait son maximum pour une concentration donnée. Cette courbe est caractéristique pour des lécithines peu purifiées et tend à disparaître ou à s'affaiblir avec la purification du lipide.

Les recherches précédentes ont été entreprises avec la saponine de Quillaya et une phytolécithine récemment extraite du Soja, émulsionnée par agitation mécanique en présence de petites quantités d'huile d'olive dans l'eau salée isotonique pour les globules du cobaye. L'émulsion mère était suffisamment dispersée pour ne pas montrer une floculation appréciable pendant au moins 24 heures en la diluant avec l'eau salée isotonique, de manière à obtenir des dilutions croissantes, entre 1/50^e et 1/100.000^e. Pour l'expérience,

(1) DELEZENNE et FOURNEAU, *Bull. Soc. chⁱm. de France*, 1914.

les tubes à hémolyse étaient chargés de 1 cc. de saponine et 1 cc. de la solution de phytolécithine. Après 2 heures de contact, on a ajouté 1 cc. de sang de cobaye lavé 3 fois et dilué 20 fois.

V

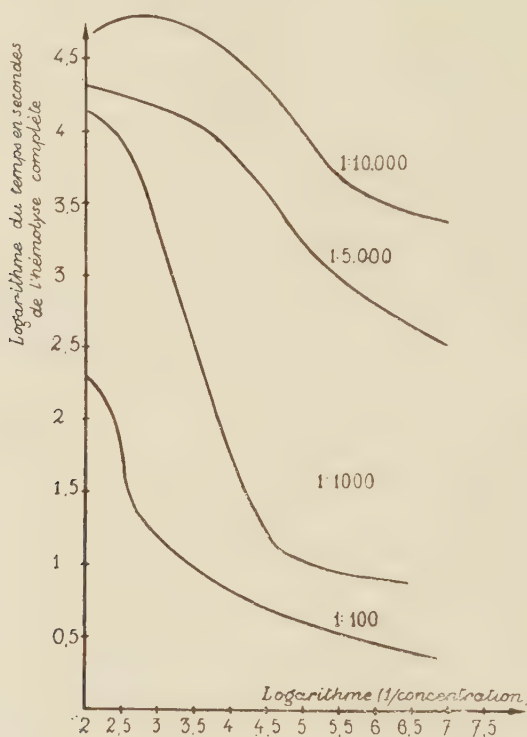
Etude de l'action hémolysante d'un complexe saponine-ovolécithine.

Une ovolécithine très purifiée protège le sang contre l'action lytique de la saponine. Mais même une lécithine très purifiée présente une courbe hémolytique qui sera d'autant plus prononcée que le mélange saponine-lécithine est moins récent. Contrairement aux mélanges récents de ces deux substances qui peuvent montrer, à certaines concentrations, une action hémolytique plus faible que chacun des constituants séparés, les mélanges de saponine et de lécithine âgés de plus de 24 heures montreront une action lytique accrue. Nous avons montré, avec un complexe phytolécithine-saponine, moins stable que le complexe ovolécithine-saponine, que cette action lytique est due à la lécithine, laquelle est dégradée par la saponine et acquiert de nouvelles propriétés lytiques qui, elles-mêmes, peuvent être partiellement inhibées par des excès de lécithine.

Nous montrons maintenant que le pouvoir protecteur de la lécithine vis-à-vis de la saponine est d'autant plus important que la quantité de saponine est plus importante. La figure ci-jointe montre ce pouvoir protecteur à l'égard des différentes concentrations de saponine comprises entre un centième et un dix-millième. On a porté en abscisses le logarithme des valeurs décroissantes des concentrations d'une ovolécithine colloïdale, et en ordonnées le logarithme du temps nécessaire pour obtenir l'hémolyse complète. Vu l'opacité du milieu dans des tubes à hémolyse contenant de hautes doses de lécithine, la lecture des résultats a dû être faite aseptiquement, surtout pour des expériences d'une longue durée. Fait essentiel, les pipettes ont été changées pour chaque dilution.

Le résultat de nos expériences indique que le temps nécessaire pour provoquer l'hémolyse était environ 250 fois plus grand pour la concentration de saponine à 1 pour 100 que pour les témoins. Pour une dilution de saponine de 1 pour 1.000, le rapport était 1/900^e ;

pour la saponine diluée à 1 pour 5.000, le rapport descendait à $1/100^e$ et enfin pour la saponine à 1 pour 10.000, il était seulement $1/24^e$ pour une même concentration en lécithine que dans les séries précédentes, et atteignait $1/44^e$ pour une concentration en lécithine 4 fois moindre. Nous ne pensons pas que l'expérience avec la saponine diluée à 1 pour 100 soit en contradiction avec la thèse émise que la lécithine protège d'autant mieux que la quantité de saponine est plus grande ; les témoins étaient lysés en 2 secondes, et il faut un temps minimum pour laisser le processus de la lyse s'accomplir. Ainsi, la lyse n'est pas appréciablement accélérée en employant des proportions encore plus importantes de saponine.



Il résulte donc qu'une quantité de la substance antilytique (lécithine) mise en contact avec une forte quantité de la substance lytique (saponine) protège relativement mieux que la même quantité de la substance anti-lytique mise en contact avec une faible quantité de la substance lytique.

Ce phénomène est incompréhensible si on considère le pouvoir

lytique des deux composants du complexe comme constant. Mais l'est-il ?

Nous avons étudié le pouvoir lytique d'une solution de saponine en fonction du temps. Nous l'avons trouvé constant pour la durée de nos expériences, avec tendance à s'affaiblir avec le temps.

Contrairement à celui de la saponine, le pouvoir hémolytique de la lécithine, qui est maximum pour une concentration donnée et s'affaiblit vers les taux plus élevés ou plus faibles, n'est pas stable et le simple séjour à l'air a tendance à l'augmenter. Cette dégradation de la lécithine est encore accentuée en présence d'un corps lytique comme le venin de Cobra ou la saponine.

Notre figure traduisant l'action lytique d'un complexe ovolé-cithine-saponine diluée à 1 pour 10.000 montre cette augmentation du pouvoir hémolytique de la lécithine. La plus forte inhibition de la saponine n'a plus lieu, comme dans les courbes précédentes, avec les plus fortes concentrations en lécithine. La courbe est devenue semblable à celle d'une lécithine à pouvoir hémolysant accru, mais qui a néanmoins conservé quelques propriétés antihémolytiques vis-à-vis de la saponine.

La lécithine employée avait la composition suivante :

Ovolécithine	10
Glycérine	8
Solution de Ringer	82 parties

La solution colloïdale avait un pH de 7,3. Les dilutions étaient préparées à partir de la solution mère avec de l'eau salée isotonique pour le mouton.

Pour l'expérience, les tubes à hémolyse étaient chargés de 1 cc. de la solution de saponine et 1 cc. de la solution de lécithine aux concentrations voulues ; après au moins 24 heures de contact, on ajoutait 1 cc. d'une suspension d'hématies de mouton, 5 fois lavées et 20 fois diluées. Par suite de ces manipulations, la dilution de la saponine indiquée sur la figure était encore étendue trois fois.

VI

Description d'une réaction permettant de déceler de très petites quantités d'un facteur lytique (Saponine).

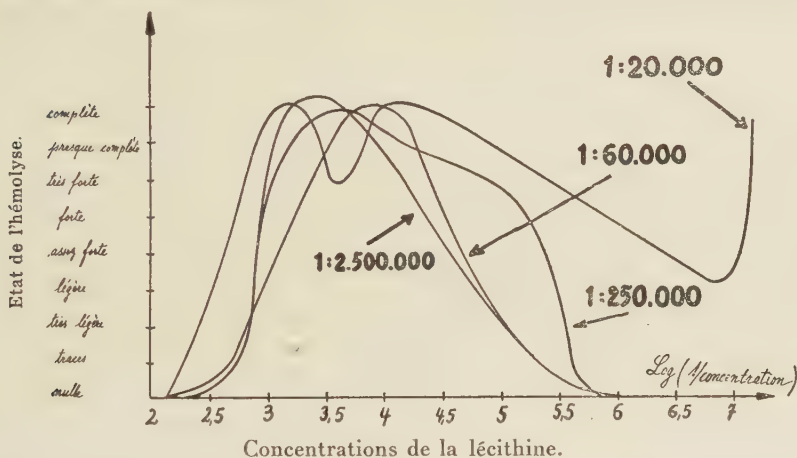
Nous avons étudié dans les pages précédentes, l'action d'un complexe saponine-lécithine sur l'intensité des processus de l'hémolyse, et nous avons constaté que l'effet de ce complexe était très différent de l'action de chacun des constituants séparés. Ainsi, le pouvoir hémolysant de la saponine passe par son maximum pour la plus forte concentration de ce corps lytique; au contraire, la lécithine a un pouvoir hémolysant qui passe par un maximum pour une concentration donnée et s'affaiblit de part et d'autre, aussi bien vers la concentration la plus élevée que vers la plus faible.

Nous attribuons ce phénomène à la formation d'un nouveau facteur lytique par dégradation de la lécithine à l'air, facteur lytique qui, lui-même, peut être inhibé par des excès de lécithine. Rappelons que la lyse provoquée par la saponine est précoce, tandis que celle due à la lécithine s'établit plus lentement. Nous mettons donc en évidence un phénomène de neutralisation qui consiste en ce que, pour certaines dilutions critiques, les mélanges récents d'une ovolécithine très purifiée et de saponine ont une action lytique moins marquée que chacun des constituants. Mais si ce phénomène existe pour une ovolécithine très purifiée pendant toute la durée de l'expérience, il peut être mis en évidence avec une phytolécithine moins purifiée et moins stable pendant les premières heures de l'expérience seulement : à la dixième heure on voit déjà apparaître la courbe caractéristique d'une lécithine dégradée. Enfin, pour l'action d'un complexe lécithine-saponine âgé d'au moins 24 heures avant l'addition du sang, nous avons trouvé que la lécithine mise en contact avec une dose relativement importante de saponine constituait une protection très efficace contre l'action lytique de la saponine. Mais nous montrons aussi qu'une quantité de substance anti-lytique (lécithine) mise en contact avec une forte quantité de substance lytique (saponine) protège relativement mieux que la même quantité de substance anti-lytique mise en contact avec une faible quantité de substance lytique. Ce phénomène est notamment expliqué par la formation d'une nouvelle substance lytique due à la dégradation

de la lécithine par la saponine, analogue à la formation de la lyso-cythine par le venin de Cobra ; puisque cette substance lytique est formée progressivement et lentement, elle ne peut pas influencer de beaucoup l'action de fortes doses de saponine, qui agissent dans un temps bref. Au contraire, quand on laissera agir sur la lécithine des doses de saponine sublytiques, l'augmentation du pouvoir lytique de la lécithine sera facilement mise en évidence.

Nous allons maintenant décrire ce phénomène, qui consiste en ce que diverses concentrations de lécithine, mises en contact pendant au moins 24 heures avec des solutions de saponine sublytiques, montrent un pouvoir lytique considérablement augmenté par rapport aux témoins.

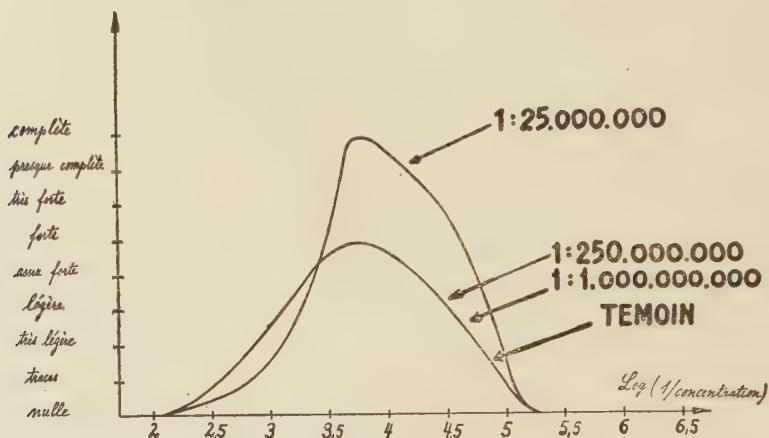
La technique employée était la suivante : des tubes à hémolyse sont chargés de 1 cc. d'une solution d'ovolécithine colloïdale à des dilutions de $1/40^e$ - $1/5.000.000^e$, ensuite on ajoute 1 cc. d'une solution de saponine de $1/20.000^e$ - $1/1.000.000.000^e$, le tout dilué dans



de l'eau isotonique pour le mouton. Après au moins 24 heures, on ajoute 1 cc. d'une suspension d'hématies de mouton, 5 fois lavée et 20 fois diluée. Lecture du résultat pendant 28 heures.

Les deux figures traduisent l'aspect de cette expérience ; on y a porté en abscisses les logarithmes des valeurs des inverses des concentrations d'une ovolécithine colloïdale, et en ordonnées le degré de l'hémolyse après 28 heures. Les chiffres indiqués dans les figures montrent la concentration en saponine du liquide mis en contact avec la lécithine, et qui a été encore trois fois diluée par l'expérimentation.

Le pouvoir hémolytique de la saponine était nul dans la série des tubes témoins, dans lesquels on avait remplacé la lécithine par l'eau salée, en ajoutant 1 cc. de saponine diluée au $1/40.000^e$. Sans l'augmentation du pouvoir hémolytique de la lécithine par la saponine, les courbes auraient dû être identiques à celle traduisant le pouvoir hémolytique de la lécithine seule (fig. 2, témoin) qui ne



montre à aucune concentration d'hémolyse plus prononcée que « forte ». Au contraire, les tubes contenant de la saponine diluée jusqu'à $1/25.000.000^e$ montrent toujours, pour une certaine concentration en lécithine, une hémolyse complète. Ce n'est qu'à partir d'une solution de saponine diluée au $1/250.000.000^e$ que la courbe lytique du complexe lécithine-saponine devient identique à celle de la lécithine seule.

Il résulte donc des expériences précédentes qu'on peut déceler de très petites doses d'un corps lytique (saponine) par l'augmentation du pouvoir hémolytique de la lécithine.

Les tableaux nos I à XI sont le compte rendu d'une expérience dans laquelle nous avons étudié l'action réciproque de la lécithine sur la saponine à des dilutions comprises entre $1/120^e$ et $1/15.000.000^e$ pour la lécithine et de $1/100^e$ jusqu'à $1/750.000.000^e$ pour la saponine.

Le temps nécessaire pour provoquer l'hémolyse complète était pour la première série lécithinée (tableau I) 250 fois supérieur par rapport aux témoins. Dans la deuxième série (tableau II), la variation était même de 1 à 900, pour retomber dans la 3^e série à

1 à 100. Dans l'étude de la 4^e série, contenant 1/30.000^e de saponine, le temps nécessaire pour l'hémolyse totale était dans le cas le plus favorable de 22 heures, tandis que les témoins étaient lysés en 30 minutes. Fait à noter : nous remarquons pour la première fois dans la 4^e série que la plus forte inhibition de l'hémolyse ne s'effectue plus dans les tubes contenant le plus fort pourcentage en lécithine.

Dans la 5^e série, les hématies sont exposées à l'action lytique d'une très faible proportion de saponine qui, au bout de 28 heures, parvient encore à exercer une action hémolytique, mais qui ne donne pas dans ce délai l'hémolyse complète. Contrairement aux expériences des séries précédentes, l'hémolyse est plus accentuée chez les hématies suspendues dans certaines concentrations de sapolécithine que dans les tubes-témoins, contenant seulement de la saponine.

Dans la sixième série, les hématies témoins suspendues dans des solutions contenant 1/180.000^e de saponine ne sont plus lysées même au bout de 28 heures, tandis que les hématies suspendues dans les solutions de sapolécithine sont encore plus fortement attaquées que celles de la série précédente.

Il en est de même du tableau VII. Ici l'action lytique de la sapolécithine atteint son maximum, et nous constatons même après 28 heures un très fort effet lytique dans une dilution de lécithine au 1/120.000^e et de saponine au 1/750.000^e.

Ce phénomène est d'autant plus intéressant que la saponine n'est habituellement plus décelable par les méthodes habituelles pour la détection de ce glucoside dans une dilution au 1/250.000^e. En effet, pour démontrer la présence de la saponine dans un liquide on titrait jusqu'ici le taux approximatif de saponine par l'action hémolysante directe du glucoside chez les hématies, tandis que la méthode que nous avons élaborée, basée sur l'augmentation du pouvoir lytique de la lécithine par des doses sublytiques de saponine, permet de déceler des doses plus petites que par les méthodes habituelles.

Dans les séries suivantes (n^{os} 8 à 10), l'action lytique de la sapolécithine redescend au fur et à mesure que la teneur en saponine diminue et pour une solution de saponine au 1/750.000.000^e, l'effet lytique est sensiblement le même que pour la lécithine seule (tableau XI).

Comme pour la plupart des réactions sérologiques, ici aussi un résultat négatif ne serait pas suffisant pour démentir la présence du

facteur lytique recherché. En travaillant avec les précautions nécessaires, nous avons pu rétablir les phénomènes décrits plus haut dans 90 % des cas.

TABLEAU I.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dilué au % suivant +	1 cmc. de saponine au 1/100 ^e +	1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour l'hémolyse complète
1	1 : 40 ^e			8 minutes.
2	1 : 80 ^e			2 minutes 10 sec.
3	1 : 160 ^e			20 sec.
4	1 : 320 ^e			14 sec.
5	1 : 640 ^e			13 sec.
6	1 : 1.280 ^e			10 sec.
7	1 : 2.560 ^e			7 sec.
5	1 : 5.000 ^e			7 sec.
6	1 : 10.000 ^e			6 sec.
7	1 : 20.000 ^e			7 sec.
8-16	1 : 40.000 ^e -			3 sec.
	1 : 280.000 ^e			3 sec.
17 et 18	1 : 2.500.000 ^e -			1 - 2 sec.
	1 : 5.000.000 ^e			

Témoins sans lécithine : 1 - 2 sec.

TABLEAU II.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/1.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1	1 : 40 ^e	1 heure, traces; 1 h. 30 minutes, léger; 1 h. 50 min., fort; 2 h. 30 min., très fort; 3 h. 40 min., hémolyse complète.
2	1 : 80 ^e	1 h., léger; 1 h. 40 min., fort; 2 h. 30 min., très fort; 3 h., hém. complète.
3	1 : 160 ^e	1 h., fort; 1 h. 45 min., très fort; 2 h. 20 min., hémolyse complète.
4	1 : 320 ^e	20 min., traces; 30 min., léger; 40 min., fort; 60 min., hémolyse presque complète; 80 min., hémolyse complète.
5	1 : 640 ^e	5 min., hémolyse complète.
6	1 : 1.280 ^e	3 min., léger; 5 min., très fort; 9 min., complète.
7	1 : 2.560 ^e	1 min., 30 sec hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	1 min., complète.
9	1 : 10.000 ^e	20 sec., complète.
10	1 : 20.000 ^e	15 sec., complète.
11	1 : 40.000 ^e	8 sec., complète.
12 et 13	1 : 80.000 ^e -	20 sec., complète.
	1 : 160.000 ^e	
14	1 : 320.000 ^e	25 sec., complète.
15	1 : 640.000 ^e	40 sec., complète.
16	1 : 1.280.000 ^e	7 sec., complète.
17	1 : 2.500.000 ^e	8 sec., complète.
18	1 : 5.000.000 ^e	15 sec., complète.

Témoins sans lécithine : hémolyse complète après 8 à 12 secondes.

TABEAU III.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine + 1 cmc. de sang au 1/5,000 ^e	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1	1 : 40 ^e	1 heure 30 minutes, traces ; 2 h. 15 min., léger ; 2 h. 30 min., fort ; 4 h., très fort ; 5 h., hémolyse complète.
2	1 : 80 ^e	1 h. 45 min., traces ; 2 h. 15 min., léger ; 3 h. 30 min., très fort ; 5 h., hémolyse complète.
3	1 : 160 ^e	1 h. 15 min., traces ; 2 h. 15 min., fort ; 2 h. 30 min., très fort ; 5 h., hémolyse complète.
4	1 : 320 ^e	1 h. 15 min., traces ; 2 h. 15 min., fort ; 3 h. 30 min., hémolyse presque complète ; 4 h. 30 min., complète.
5	1 : 640 ^e	1 h., traces ; 2 h. 15 min., fort ; 2 h. 30 min., hémolyse complète.
6	1 : 1.280 ^e	40 min., traces ; 1 h. 15 min., fort ; 2 h. 15 min., très fort ; 2 h. 30 min., hémolyse complète.
7	1 : 2.560 ^e	35 min., traces ; 40 min., fort ; 1 h. 15 min., très fort ; 2 h. 15 min., hémolyse presque complète ; 2 h. 30 min., hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	15 min., traces ; 40 min., fort ; 1 h. 15 min., hémolyse presque complète ; 2 h. 15 min., hémolyse complète.
9	1 : 10.000 ^e	15 min., traces ; 17 min., léger ; 25 min., fort ; 40 min., très fort ; 1 h. 15 min., hémolyse complète.
10	1 : 20.000 ^e	15 min., léger ; 30 min., très fort ; 40 min., hémolyse complète.
11	1 : 40.000 ^e	17 min., très fort ; 25 min., complète.
12	1 : 80.000 ^e	8 min., traces ; 10 min., léger ; 15 min., fort ; 17 min., complète.
13	1 : 160.000 ^e	5 min., traces ; 8 min., fort ; 10 min., très fort ; 15 min., hémolyse complète.
14	1 : 320.000 ^e	5 min., traces ; 8 min., très fort ; 10 min., hémolyse presque complète ; 15 min., hémolyse complète.
15-18	1 : 640.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse complète en 3 minutes.

Tubes 19-24 (témoins sans lécithine. Hémolyse complète en 3 minutes.

TABLEAU IV.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/10.000 + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1	1 : 40 ^e	1 heure 30 minutes, traces ; 6 h., fort ; 12 h., hémolyse complète.
2	1 : 80 ^e	1 h. 30 min., traces ; 8 h., fort ; 14 h., complète.
3	1 : 160 ^e	1 h., traces ; 1 h. 30 min., léger ; 18 h., très fort ; 22 h., hémolyse complète.
4-8	1 : 320 ^e - 1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 3 h., léger ; 8 h., fort ; 16 h., 18 h., hémolyse complète.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 3 h., léger ; 8 h., fort ; 16 h., 18 h., hémolyse complète.
10	1 : 20.000 ^e	1 h., traces ; 4 h., fort ; 8 h., presque complète ; 9 h., hémolyse complète.
11-12	1 : 40.000 ^e - 1 : 80.000 ^e	Hémolyse complète après 1 heure.
13-15	1 : 160.000 ^e - 1 : 640.000 ^e	Hémolyse complète après 40-45 minutes.
16-18	1 : 1.280.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse complète après 25-30 minutes.

Tubes 19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse complète en 25-30 minutes.

TABLEAU V.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/20.000 + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1	1 : 40 ^e	Aucune hémolyse après 28 heures.
2	1 : 80 ^e	Traces d'hémolyse après 1 h. ; même état d'hémolyse après 28 h.
3	1 : 160 ^e	1 h., traces ; 20 h., léger ; 24 h., fort ; 28 h., très fort.
4	1 : 320 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 20 h., fort ; 24 h., très fort ; 28 h., hémolyse complète.
5	1 : 640 ^e	1 h., léger ; 8 h., fort ; 17 h., complète.
6	1 : 1.280 ^e	1 h., fort ; 20 h., très fort ; 26 h., très fort.
7	1 : 2.560 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 3 h., fort ; 20 h., très fort ; 24 h., presque complète ; 28 h., hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 3 h., fort ; 5 h., très fort ; 20 h., très fort ; 24 h., hémolyse complète.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 2 h., très fort ; 3 h., presque complète ; 3 h. 30 min., complète.
10	1 : 20.000 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 5 h., fort ; 20 h., très fort ; 28 h., presque complète.
11	1 : 40.000 ^e	2 h., traces ; 20 h., fort ; 28 h., très fort.
12	1 : 80.000 ^e	20 h., traces ; 24 h., fort ; 28 h., très fort.
13	1 : 160.000 ^e	Tube cassé.
14	1 : 320.000 ^e	3 h., traces ; 20 h., très fort ; 28 h., très fort.
15	1 : 640.000 ^e	3 h., traces ; 5 h., fort ; 28 h., fort.
16	1 : 1.280.000 ^e	3 h., traces ; 5 h., fort ; 28 h., fort.
17	1 : 2.500.000 ^e	3 h., traces ; 5 h., léger ; 28 h., léger.
18	1 : 5.000.000 ^e	4 h., traces ; 10 h., fort ; 18 h., complète.
19-24	témoins sans lécithine	3 h., traces ; 10 h., léger ; 28 h., fort.

TABLEAU VI.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/60.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-3	1 : 40 ^e /1 : 160 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
4	1 : 320 ^e	1 h., traces ; 20 h., léger ; 28 h., léger.
5	1 : 640 ^e	1 h., traces ; 20 h., léger ; 22 h., fort ; 24 h., hémolyse presque complète ; 28 h., presque complète.
6	1 : 1.280 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 8 h., fort ; 20 h., très fort ; 28 h., hémolyse presque complète.
7	1 : 2.560 ^e	1 h., léger ; 2 h., fort ; 20 h., très fort ; 24 h., hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 16 h., fort ; 24 h., hémolyse presque complète ; 28 h., hémolyse complète.
9	1 : 10.000 ^e	4 h., traces ; 28 h., léger.
10	1 : 20.000 ^e	4 h., traces ; 28 h., traces.
11-18	1 : 40.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse nulle après 28 h.

19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse nulle après 28 h.

TABLEAU VII.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/250.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-3	1 : 40 ^e /1 : 160 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
4	1 : 320 ^e	1 h., traces ; 20 h., léger ; 22 h., fort ; 24 h., très fort ; 28 h., hémolyse presque complète.
5	1 : 640 ^e	1 h., léger ; 18 h., fort ; 25 h., très fort ; 28 h., hémolyse presque complète.
6	1 : 1.280 ^e	1 h., léger ; 18 h., fort ; 25 h., presque complète ; 27 h., complète.
7	1 : 2.560 ^e	1 h., léger ; 16 h., fort ; 22 h., très fort ; 24 h., hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 4 h., léger ; 21 h., fort ; 24 h., presque complète ; 28 h., presque complète.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 4 h., léger ; 19 h., fort ; 28 h., très fort.
10	1 : 20.000 ^e	3 h., traces ; 16 h., léger ; 20 h., fort ; 28 h., très fort.
11	1 : 40.000 ^e	18 h., hémolyse nulle ; 25 h., léger ; 26 h., fort ; 28 h., fort.
12	1 : 80.000 ^e	18 h., hémolyse nulle ; 25 h., traces ; 26 h., fort ; 28 h., fort.
13-18	1 : 160.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse nulle après 28 h.

19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse nulle après 28 h.

TABLEAU VIII.

No du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant +1 cmc. de saponine au 1/2.500.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-3	1 : 40 ^e /1 : 160 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
4	1 : 320 ^e	1 h., traces ; 10 h., léger ; 20 h., fort ; 24 h., très fort ; 28 h., très fort.
5	1 : 640 ^e	1 h., traces ; 18 h., léger ; 25 h., fort ; 28 h., très fort.
6	1 : 1.280 ^e	1 h., léger ; 18 h., fort ; 24 h., très fort ; 28 h., hémolyse complète.
7	1 : 2.560 ^e	Même courbe que tube N° 6.
8	1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 19 h., léger ; 24 h., fort ; 28 h., très fort.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 17 h., léger ; 28 h., fort.
10	1 : 20.000 ^e	4 h., traces ; 28 h., léger.
11	1 : 40.000 ^e	24 h., traces ; 28 h., traces.
12	1 : 80.000 ^e	Hémolyse nulle après 24 h. ; traces après 28 h.
13-18	1 : 160.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.

19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse nulle après 28 h.

TABLEAU IX.

No du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant +1 cmc. de saponine au 1/2.500.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-3	1 : 40 ^e /1 : 160 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
4	1 : 320 ^e	1 h., traces ; 28 h., traces.
5	1 : 640 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 28 h., léger.
7	1 : 2.560 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 3 h. 30 min., fort ; 16 h., très fort ; 23 h., hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 20 h., fort ; 25 h., très fort ; 28 h., hémolyse presque complète.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 6 h., léger ; 17 h., fort ; 28 h., très fort.
10	1 : 20.000 ^e	12 h., traces ; 25 h., léger ; 28 h., fort.
11-18	1 : 40.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse nulle après 28 h.

19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse nulle après 28 h.

TABLEAU X.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/25.000.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-3	1 : 40 ^e /1 : 160 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
4	1 : 320 ^e	1 h., traces ; 28 h., traces.
5	1 : 640 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 28 h., léger.
6	1 : 1.280 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 28 h., léger.
7	1 : 2.560 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 3 h. 30 min., fort ; 16 h., très fort ; 23 h., hémolyse complète.
8	1 : 5.000 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 20 h., fort ; 25 h., très fort ; 28 h., hémolyse presque complète.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 6 h., léger ; 17 h., fort ; 28 h., très fort.
10	1 : 20.000 ^e	12 h., traces ; 25 h., léger ; 28 h., fort.
11-18	1 : 40.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse nulle après 28 h.

19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse nulle après 28 h.

TABLEAU XI.

N ^o du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. de saponine au 1/250 000.000 ^e + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-2	1 : 40 ^e /1 : 80 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
3	1 : 160 ^e	2 h., traces ; 28 h., traces.
4	1 : 320 ^e	2 h., traces ; 28 h., traces.
5	1 : 640 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 28 h., léger.
6	1 : 1.280 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 25 h., fort ; 28 h., fort.
7	1 : 2.560 ^e	1 h., traces ; 2 h., léger ; 24 h., fort ; 28 h., fort.
8	1 : 5.000 ^e	Même courbe que tube N ^o 7.
9	1 : 10.000 ^e	1 h., traces ; 15 h., léger ; 28 h., léger.
10	1 : 20.000 ^e	17 h., traces ; 28 h., traces.
11	1 : 40.000 ^e	20 h., traces ; 28 h., traces.
12-18	1 : 80.000 ^e - 1 : 5.000.000 ^e	Hémolyse nulle après 28 h.

19-24 (témoins sans lécithine). Hémolyse nulle après 28 h.

TABLEAU XII. — *Témoins sans saponine.*

N° du tube	1 cmc. de lécithine dans le % suivant + 1 cmc. d'eau salée + 1 cmc. de sang	Temps nécessaire pour différents stades de l'hémolyse
1-2	1 : 40 ^e /1 : 80 ^e	Hémolyse nulle après 28 heures.
3	1 : 160 ^e	16 h., traces ; 28 h., traces.
4	1 : 320 ^e	9 h., traces ; 28 h., traces.
5	1 : 640 ^e	4 h., traces ; 18 h., léger ; 28 h., léger.
6	1 : 1.280 ^e	2 h., traces ; 4 h., léger ; 24 h., fort ; 28 h., fort.
7-8	1 : 2.560 ^e - 1 : 5.000 ^e	Même courbe que tube N° 6.
9	1 : 10.000 ^e	4 h., traces ; 28 h., léger.
10	1 : 20.000 ^e	20 h., traces ; 28 h., traces.
12-18	1 : 40.000 ^e - 15.000.000 ^e :	Hémolyse nulle après 28 h.

CHAPITRE VI

Influence de la lécithine colloïdale sur le phénomène de la lyse microbienne par le bactériophage.

Nous avons démontré dans les chapitres précédents que les actions cytolytiques et hémolytiques de plusieurs saponines étaient partiellement inhibées par l'addition préalable des émulsions de diverses lécithines et saponines. Nous avons eu l'idée de reproduire le même phénomène dans la lyse transmissible de microbes par le bactériophage.

Dans nos expériences faites avec des Paramécies et des hématies, l'inhibition de la lyse était surtout très prononcée avec la lécithine en solution colloïdale décrite plus haut. Il n'en est pas de même dans le cas du bactériophage. Le facteur lytique de la lécithine ne semble aucunement influencer les bactéries et le bactériophage. Par contre, les meilleurs résultats sont obtenus avec des solutions de lécithine fraîchement préparées, et l'action inhibitrice de la lécithine s'affaiblit très rapidement avec le vieillissement des solutions colloïdales. Nous donnerons donc seulement les résultats sommaires de notre expérimentation avec la lécithine colloïdale.

Expériences : 0,5 cc. de bactériophage antistaphylococcique récemment filtré sur bougie Chamberland L3 d'un pouvoir lytique très prononcé était mélangé dans une série de 17 tubes à hémolyse à 0,5 cc. de solution colloïdale de lécithine en concentrations croissantes, comprises entre 1/20^e et 1/6.400^e. Dans 8 tubes le bactériophage était additionné de 0,5 cc. d'eau physiologique ou de bouillon pour servir de témoin ; huit tubes recevaient 0,5 cc. de lécithine (1/20^e-1/400^e), huit autres 0,5 cc. d'eau physiologique. Tous ces tubes étaient mis pendant 24 heures (36 heures dans d'autres expériences) à l'étuve à 37°. Après ce temps 0,5 cc. de chaque tube

étaient ajoutés à 0,5 cc. d'une suspension de staphylocoques, préparée récemment avec une anse d'une culture sur gélose âgée de 24 heures en 10 cc. de bouillon. Par cette manipulation les concentrations de lécithine étaient donc diminuées de moitié ($1/40^e$ - $1/12.800^e$). Le tout était remis à l'étuve pendant 24 heures. L'examen macroscopique des tubes étant rendu difficile par suite de l'opalescence provoquée par la solution de lécithine, nous étions obligés de recourir au procédé d'ensemencement en boîte de Pétri pour déterminer le taux de la lyse.

Dans ce but nous avons prélevé à l'aide d'une micropipette 0,1 cc. de chaque tube contenant le mélange de bactériophage lécithiné et de staphylocoques, ainsi que des témoins, et nous l'avons déposé dans une boîte de Pétri contenant V gouttes de bouillon ; puis nous avons fait couler 5 cc. de gélose dans chaque boîte, en agitant soigneusement afin d'obtenir une répartition homogène. Par cette deuxième manipulation la lécithine a été encore diluée 50 fois. La concentration terminale de la lécithine était donc de $1/320.000^e$ dans la plus basse dilution active. Les boîtes placées à l'étuve étaient examinées après 48 heures.

Nous avons constaté, par la méthode de numération des colonies dans les boîtes de Pétri, que le staphylocoque se développait en milieu lécithiné au moins aussi bien qu'en milieu non-lécithiné.

Les boîtes de Pétri coulées à partir des tubes contenant le mélange de staphylocoque et de bactériophage non lécithiné étaient stériles ou montraient tout au plus quelques colonies (3-5).

Les boîtes de Pétri provenant de témoins (staphylocoques en bouillon dilué avec de l'eau physiologique ou avec la solution de lécithine) étaient recouvertes d'un enduit épais composé d'innombrables colonies.

Dans les boîtes ensemencées avec le mélange de staphylocoque et de bactériophage lécithiné au $1/20^e$, le développement du staphylocoque égalait au moins celui des témoins. A $1/200^e$ des milliers de colonies de staphylocoques avaient encore poussé. Au $1/2.000^e$, l'action du bactériophage était déjà très marquée, mais il y avait tout de même jusqu'à 100 colonies par boîte de Pétri. L'examen confirmait que les colonies qui avaient poussé étaient bien des colonies de staphylocoques.

Dans une autre série d'expériences effectuées selon la même technique, les staphylocoques résistaient encore à l'action lytique du

bactériophage dans des concentrations initiales de lécithine, comprises entre $1/20^e$ et $1/3.200^e$. Au-dessus de $1/3.200^e$ le développement de staphylocoque n'avait pas lieu; aux concentrations intermédiaires l'action du bactériophage se manifestait progressivement au fur et à mesure que la concentration de la lécithine diminuait.

Nous avons déterminé la dose du bactériophage nécessaire pour lyser en 24 heures 0,5 cc. de la suspension microbienne dont nous nous étions servis. La dose du bactériophage employée dans toutes nos expériences ci-dessus était vingt fois supérieure à cette dose minima. C'est pourquoi, en employant des doses plus petites de bactériophage, nous avons obtenu des résultats encore plus favorables.

Il était intéressant de savoir si le bactériophage était détruit par l'action de la lécithine ou si seulement la lécithine ne lui permettait pas d'exercer son action lytique. Nous avons remarqué, dans des expériences faites avec des mélanges de saponines et de lécithines, qu'une sapolécithine peu toxique récupérerait partiellement sa toxicité par dilutions progressives. Pour séparer autant que possible le bactériophage de la lécithine nous avons dilué le bactériophage lécithiné au $1/20^e$ -100.000 fois. Le bactériophage, qui par son contact avec la lécithine avait perdu son action lytique, se montrait de nouveau très actif et une goutte lysait en 12 heures une anse de staphylocoques suspendus dans 10 cc. de bouillon. Le principe lytique, régénéré de cette façon, se multipliait et s'est montré repiquable pendant plusieurs générations.

Nous arrivons à la conclusion que la lécithine en solution colloïdale inhibe ou affaiblit considérablement le pouvoir lytique du bactériophage antistaphylococcique. Le bactériophage, inactif en présence de la lécithine, peut être ensuite régénéré par des fortes dilutions et se montre repiquable. L'étude de ces faits pourra peut-être contribuer à l'éclaircissement du phénomène curieux que l'action du bactériophage dans l'organisme est loin d'égaliser l'action si énergique que le bactériophage développe *in vitro*.

CHAPITRE VII

Inhibition et affaiblissement de la lyse microbienne transmissible en présence de diverses lécithines.

Nous avons vu plus haut que les propriétés lytiques du bactériophage antistaphylococcique étaient inhibées ou affaiblies par un contact de 6 à 36 heures à 37° avec la lécithine en solution colloïdale. Nous avons essayé de reproduire les mêmes phénomènes avec d'autres souches de bactériophage et avec d'autres lécithines, notamment une lécithine provenant de jaune d'œuf (POULENC) et une lécithine d'origine végétale, provenant du Soja et exempte de cholestérine et de matières grasses.

Les émulsions de ces lécithines ont été préparées de la manière suivante : on mélange soigneusement dans un mortier 5 gr. de lécithine avec 8-12 cc. de glycérine en ajoutant, goutte à goutte, environ 10 cc. d'eau physiologique. On met le tout dans un flacon de 500 cc. rempli d'un quart de bille de verre, puis on ajoute de l'eau salée à 8 pour 1.000 jusqu'à 250 cc. (L'émulsion qui en résulte est donc à 2 pour 100.) On homogénise sur un agitateur mécanique pendant 6 heures en maintenant la température du mélange à 45°. Ces manipulations sont faites stérilement. On répartit en ampoules stériles et tyndallise à 58°. On laisse sédimenter les gros flocons et emploie le liquide surnageant, dont la teneur en lécithine est d'environ à 2 pour 1.000 par rapport au poids sec.

Le liquide employé, d'une préparation relativement simple, est homogène, opalescent, couleur de lait dilué et peut être ensuite dilué d'emblée avec de l'eau salée en toutes proportions sans flocculer. Nous avons employé le bactériophage original de Twort avec la souche correspondante de staphylocoques et un autre bactériophage antistaphylococcique que nous devons à l'obligeance de

M. LEGROUX. Le bactériophage était toujours récemment filtré sur bougie Chamberland L3 et montrait un grand pouvoir lytique. Nous avons employé, dans nos expériences, des suspensions microbiennes préparées avec une anse d'une culture âgée de 18 heures sur gélose, suspendue dans 10 cc. de bouillon. Une goutte de nos bactériophages lysait 10 cc. de cette suspension en moins de 24 heures.

Vu que la lyse microbienne transmissible est strictement liée au départ de la culture, nous avons recherché si le staphylocoque se développait en présence de lécithine. L'observation directe étant rendue impossible par l'opacité du milieu lécithiné, nous avons eu recours aux procédés de numération des colonies sur boîtes de Pétri, ainsi qu'aux procédés de fermentation des sucres en présence de tournesol. Nous avons constaté que la rapidité et l'abondance du développement, en milieu contenant la lécithine dans les mêmes proportions que dans les expériences ci-dessus, égalait le développement du staphylocoque en milieu non lécithiné.

Dans toutes les expériences nous nous sommes servis d'une nouvelle pipette pour chaque tube, et nous avons contrôlé chaque fois la pureté de nos cultures.

Expérience I. — 5 tubes à hémolyse contenant chacun 0,5 cc. de bactériophage ont été additionnés de 0,5 cc. de solution de lécithine Poulenc à différentes concentrations, afin d'obtenir dans les tubes les concentrations suivantes : $1/2$ - $1/4$ - $1/8$ - $1/16$ - $1/32$ de la solution mère de lécithine. Deux tubes témoins ont reçu 0,5 cc. de bactériophage et 0,5 cc. d'eau physiologique ; séjour à l'étuve pendant 24 heures. Ensuite 0,5 cc. de chaque tube ont été ajoutés à 0,5 cc. d'une suspension de Staphylocoques ; séjour de 28 heures à l'étuve ; puis 0,1 cc. de chaque tube a été déposé dans une boîte de Pétri contenant V gouttes de bouillon. On fait couler 5 cc. de gélose dans chaque boîte de Pétri en agitant soigneusement ; séjour de 48 heures à l'étuve et examen à un faible grossissement (*v. tableau I, p. 50*).

Il ressort de cette expérience que le bactériophage lécithiné à $1/32^e$ de notre solution mère ($1/16.000^e$), par rapport au poids sec, n'exerce aucune action lytique.

Expérience II. — Les tubes à hémolyse numérotés de 1-12 et deux tubes témoins reçoivent chacun 0,5 cc. de bactériophage non dilué. Les tubes 13-24 et deux tubes témoins reçoivent chacun 0,5 cc. du

TABLEAU I.

Dilution de la solution-mère contenant le Bactériophage	Degré de développement de la culture
1/2 ^e	Colonies innombrables.
1/4 ^e	Colonies innombrables.
1/8 ^e	En moyenne 90 colonies par champ microscopique ; les colonies sont en partie lysées.
1/16 ^e	Colonies innombrables.
1/32 ^e	Colonies innombrables.
Témoins <i>avec</i> léci- thine sans Bacté- riophage.....	Colonies innombrables.
Témoins <i>sans</i> léci- thine avec Bacté- riophage.....	15 colonies par boîte de Pétri.

même bactériophage, mais dilué de moitié. Les tubes 25-36 et deux tubes témoins reçoivent le même bactériophage, mais dilué à 1/10^e. On ajoute à chaque tube 0,5 cc. de phytolécithine afin d'obtenir des concentrations décroissantes comprises entre 1/2 et 1/4.000^e de la solution mère, avec un coefficient égal à 2. Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, chaque tube reçoit 0,5 cc. d'une suspension de staphylocoques. Nouveau séjour de 24 heures à l'étuve. On coule dans des boîtes de Pétri, selon la technique décrite dans l'expérience n° I ; séjour de 28 heures à l'étuve et examen.

TABLEAU II.

Dilution de la solution-mère contenant le Bactériophage	Tubes nos 1-12 (Bactériophage non dilué)
1/2 ^e	Colonies innombrables : granuleuses et petites.
1/4 ^e	Colonies innombrables : granuleuses et petites.
1/8 ^e	Très nombreuses colonies : petites.
1/16 ^e	Colonies innombrables : granuleuses et vitreuses.
1/32 ^e	Colonies innombrables : granuleuses, petites et vitreuses.
1/64 ^e	Très nombreuses colonies : granuleuses, petites et vitreuses.
1/128 ^e	Colonies innombrables : granuleuses, petites et vitreuses.
1/250 ^e	Colonies innombrables : granuleuses, petites et vitreuses.

1/500 ^e	Colonies innombrables, vitreuses, petites.
1/1.000 ^e	Colonies innombrables, vitreuses, petites.
1/2.000 ^e	18 colonies par boîte de Pétri : grandes et vitreuses.
1/4.000 ^e	7 colonies par boîte de Pétri : grandes.

Témoins *avec* Bactériophage sans lécithine. La boîte de Pétri est restée stérile.

Témoins *sans* Bactériophage avec lécithine. Colonies normales innombrables.

Dilution
de la solution-mère
contenant
le Bactériophage

Tubes nos 13-24
(Bactériophage dilué à moitié)

1/2 ^e	Colonies innombrables : grandes, granuleuses, vitreuses.
1/4 ^e	Innombrables petites colonies.
1/8 ^e	Innombrables colonies petites et vitreuses.
1/16 ^e	Innombrables colonies petites, granuleuses, vitreuses.
1/32 ^e	Plus de 1.000 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses et vitreuses.
1/64 ^e	Plus de 1.000 petites colonies par champ microscopique : granuleuses et vitreuses.
1/128 ^e	Plus de 1.000 petites colonies par champ microscopique : granuleuses et vitreuses.
1/250 ^e	Plus de 1.000 petites colonies par champ microscopique : granuleuses et vitreuses.
1/500 ^e	Plus de 1.000 petites colonies par champ microscopique : granuleuses et petites.
1/1.000 ^e	Environ 50 petites colonies granuleuses par champ microscopique.
1/2.000 ^e	Environ 10 petites colonies granuleuses par champ microscopique.
1/4.000 ^e	La boîte de Pétri est restée stérile.

Témoins *avec* Bactériophage sans lécithine. Environ 8 colonies par champ microscopique.

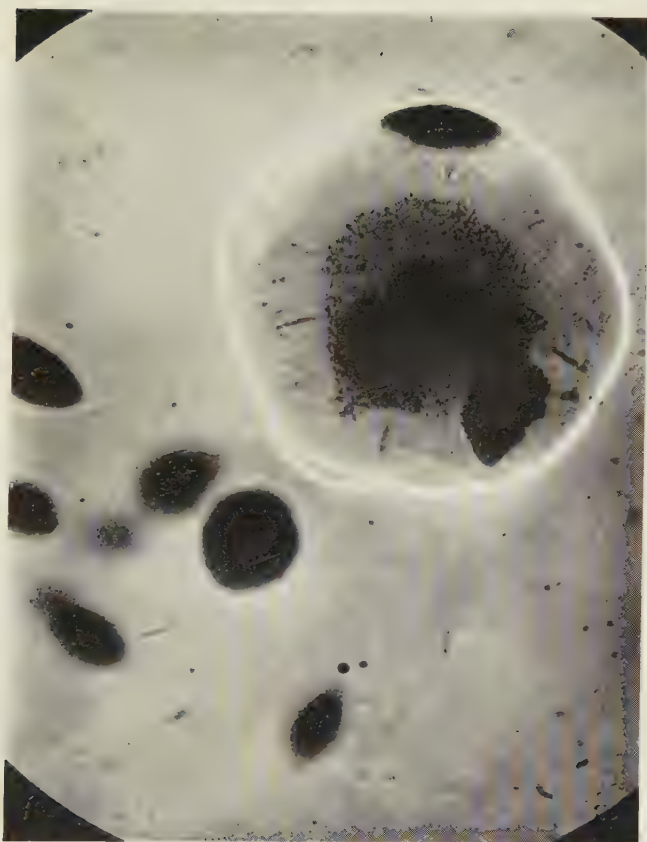
Témoins *sans* Bactériophage avec lécithine Colonies innombrables.

Dilution de la solution-mère contenant le Bactériophage	Tubes nos 25-36 (Bactériophage dilué au 1/10 ^e)
1/2 ^e	Colonies innombrables : grandes et vitreuses.
1/4 ^e	Colonies innombrables : grandes et vitreuses.
1/8 ^e	Colonies innombrables : grandes et vitreuses.
1/16 ^e	Plus de 1.000 colonies normales par champ microscopique.
1/32 ^e	Colonies innombrables : petites et granuleuses.
1/64 ^e	Colonies innombrables : petites et granuleuses.
1/128 ^e	Plus de 1.000 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses, vitreuses.
1/250 ^e	Moins de 1.000 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses, vitreuses.
1/500 ^e	Moins de 1.000 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses et vitreuses.
1/1.000 ^e	15 petites colonies granuleuses par boîte de Pétri.
1/2.000 ^e	5 petites colonies granuleuses par boîte de Pétri.
1/4.000 ^e	12 colonies par boîte de Pétri.
Témoins <i>avec</i> Bactériophage sans lécithine.....	Environ 18 colonies par boîte de Pétri.
Témoins <i>sans</i> Bactériophage avec lécithine	Colonies innombrables par champ microscopique.

Il se produit dans cette expérience un phénomène paradoxal : le bactériophage dilué au 1/10^e, lysant le moins dans les boîtes témoins, est moins inhibé que le bactériophage non dilué qui avait lysé tous les microbes dans les témoins. Nous avons constaté, au cours de nos expériences, des faits analogues. Il ressort néanmoins de cette expérience que le bactériophage, mis en contact avec la phytolécithine en concentration de 1/500^e de la solution mère (1/250.000^e du poids sec) était encore fortement inhibé.

Il faut noter qu'après 48 heures on constatait dans les tubes de l'expérience n° II un progrès de la lyse. Mais après 6 jours, dans tous les tubes renfermant le bactériophage lécithiné, le staphylocoque s'était fortement développé, tandis que les tubes renfermant le bactériophage non lécithiné restaient stériles.

Expérience III. — Dans d'autres expériences effectuées avec trois lécithines (ovolécithine colloïdale, lécithine Poulenc et phytolécithine) nous avons ajouté la lécithine en même temps que le bactériophage à la suspension microbienne. Les résultats étaient



Microphotographie d'une partie d'une boîte de Pétri contenant de la lécithine diluée au $1/80.000.000^e$; on remarque une grande colonie attaquée par le bactériophage en présence de plusieurs colonies normales. La boîte de Pétri témoin sans lécithine était entièrement stérile.

inférieurs à ceux obtenus dans les expériences où le bactériophage avant d'être ajouté à la suspension microbienne avait préalablement été en contact avec les lécithines. Nous citons à titre d'exemple les résultats d'une expérience :

Dans 12 tubes à hémolyse marqués de 1-12 nous avons introduit 0,2 cc. de bactériophage, 0,3 cc. de suspension microbienne et 0,5 cc. de solution de phytolécithine en concentrations décroissantes, afin d'établir des dilutions de la solution-mère comprises entre $1/2$ et $1/4.000^e$ avec un coefficient égal à 2.

Deux tubes témoins ont reçu à la place de la solution de phytolécithine 0,5 cc. d'eau salée à 8 pour 1.000 et deux autres tubes témoins, 0,3 cc. de la suspension microbienne, 0,5 cc. de lécithine et 0,2 cc. d'eau salée pour remplacer le bactériophage. Séjour à l'étuve pendant 24 heures à une température de 37° , ensemencement en boîtes de Pétri et examen de mêmes boîtes après 24 et 100 heures (*Voy. tabl. III*).

TABEAU III.

Dilution de la solution-mère	Aspect de la boîte de Pétri 24 heures après l'ensemencement
$1/2^e$	130 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses et vitreuses.
$1/4^e$	300 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses et vitreuses.
$1/8^e$	5 colonies par champ microscopique : petites, granuleuses et vitreuses.
$1/16^e$	Contamination.
$1/32^e$	20 petites colonies normales par champ microscopique.
$1/64^e$	2 petites colonies granuleuses par champ microscopique.
$1/128^e$	2 petites colonies granuleuses par champ microscopique.
$1/250^e$	2 petites colonies granuleuses par champ microscopique.
$1/500^e$	Quelques petites colonies granuleuses par boîte de Pétri.
$1/1.000^e$	Quelques petites colonies granuleuses par boîte de Pétri.
$1/2.000^e$	Quelques petites colonies granuleuses par boîte de Pétri.
$1/4.000^e$	Boîte de Pétri, stérile.
Témoins avec Bactériophage sans lécithine.....	Boîte de Pétri, stérile.
Témoins sans Bactériophage avec lécithine	Colonies innombrables.

Dilution
de la solution-mère

Aspect de la boîte de Pétri
100 heures après l'ensemencement

1/2 ^e	70 colonies par champ microscopique : grandes et vitreuses.
1/4 ^e	350 colonies par champ microscopique : grandes et granuleuses.
1/8 ^e	150 colonies par champ microscopique : grandes et vitreuses.
1/16 ^e	Contamination.
1/32 ^e	100 grandes colonies vitreuses par champ microscopique.
1/64 ^e	16 grandes colonies normales par champ microscopique.
1/128 ^e	17 grandes colonies normales par champ microscopique.
1/250 ^e	21 grandes colonies vitreuses par champ microscopique.
1/500 ^e	6 grandes colonies normales par champ microscopique.
1/1.000 ^e	Quelques petites colonies granuleuses par boîte de Pétri.
1/2.000 ^e	100 colonies par boîte de Pétri : grandes, vitreuses et granuleuses.
1/4.000 ^e	8 colonies par champ microscopique : grandes normales et petites granuleuses.

Témoins *avec* Bactériophage sans lécithine.....

Pas de colonies. Boîte stérile.

Témoins *sans* Bactériophage avec lécithine

Colonies innombrables.

En évaluant les résultats des expériences il faut tenir compte du fait suivant : la solution-mère avait approximativement une teneur en lécithine de 2 pour 1.000 par rapport au poids sec. En ajoutant 0,5 cc. de bactériophage lécithiné à 0,5 cc. de la suspension microbienne la concentration de lécithine a été diminuée encore deux fois. Enfin en déposant dans les boîtes de Pétri 0,1 cc. du mélange et en y coulant 5 cc. de gélose, on diluait la lécithine encore 50 fois, de sorte que la concentration de lécithine présente pendant la lyse microbienne même, était deux fois, et celle qui se trouvait dans la boîte de Pétri, 100 fois inférieure aux concentrations dans lesquelles avait séjourné le bactériophage. La teneur en lécithine par rapport au poids sec tombait parallèlement.

Le tableau IV indique la teneur des trois dilutions en lécithine par rapport à son poids sec.

TABLEAU IV.

Stade des dilutions	Teneur des dilutions en lécithine (poids sec) par rapport à la solution-mère		
	1/2 ^e	1/1.000 ^e	1/4.000 ^e
<i>Dilution 1.</i> Bactériophage lécithiné	1/1.000 ^e	1/20.000 ^e	1/80.000 ^e
<i>Dilution 2.</i> Bactériophage dilué + bactéries	1/2.000 ^e	1/40.000 ^e	1/160.000 ^e
<i>Dilution 3.</i> 0,1 cc. de la dilution 2 dans 5 cc. de gélose	1/100.000 ^e	1/2.000.000 ^e	1/8.000.000 ^e

Les manipulations effectuées au cours des expériences contribuaient de façon égale à la dilution du bactériophage lécithiné et du bactériophage témoin. Le tableau V indique le degré de ces dilutions.

TABLEAU V.

Stades des dilutions	Bactériophage non dilué	Bactériophage dilué à moitié	Bactériophage dilué au dixième
<i>Dilution 1.</i> Bactériophage + lécithine.....	1/2 ^e	1/4 ^e	1/20 ^e
<i>Dilution 2.</i> Bactériophage lécithiné + staphylocoques	1/4 ^e	1/8 ^e	1/40 ^e
<i>Dilution 3.</i> 0,1 cc. de la dilution n° 2 dans 5 cc. de gélose ...	1/20 ^e	1/400 ^e	1/2.000 ^e

Il était intéressant de savoir si le bactériophage était détruit par les lécithines ou si seulement les lécithines ne lui permettaient pas d'exercer son action lytique. Pour séparer autant que possible le bactériophage de la lécithine, nous avons dilué le bactériophage lécithiné 4.000.000 fois. Le bactériophage, qui par son contact avec la lécithine avait perdu son action lytique, se montrait de nouveau très actif : une goutte lysait en douze heures 1 cc. d'une suspension de staphylocoques préparée à raison d'une anse pour 10 cc. de bouillon. Le principe lytique, régénéré de cette façon, se multipliait et se montrait repiquable pendant plusieurs générations.

Dans de très nombreuses expériences que nous avons entreprises nous avons constaté que le phénomène de l'inhibition du pouvoir lytique du bactériophage se répétait avec une constance remar-

quable, pourvu que l'émulsion de lécithine fût d'une préparation tout à fait récente. Par contre, l'âge de la lécithine employée ne semble pas être un facteur décisif, car nous avons eu des résultats très semblables à ceux décrits avec des lécithines âgées de 20 ans.

Dans une autre série d'expériences, nous avons remplacé la lécithine par une émulsion récente de cholestérine. Les résultats sont assez comparables à ceux obtenus avec les lécithines, sauf que l'inhibition du pouvoir lytique du bactériophage s'exerçait encore parfois en présence des solutions de cholestérine plus étendues ; d'autre part l'inhibition du bactériophage était moins régulière.

Il ressort de nos expériences que les émulsions de lécithine provenant de jaune d'œuf, les émulsions de phytolécithine et de cholestérine, même en concentrations minimales, inhibent ou affaiblissent considérablement le pouvoir lytique du bactériophage antistaphylococcique.

Le bactériophage n'est pas détruit, car il peut être régénéré et se montre repiquable. Le phénomène de l'inhibition du bactériophage par la lécithine et la cholestérine nous semble particulièrement intéressant, vu la présence de ces deux corps dans toute matière vivante.

CHAPITRE VIII

Augmentation de la radio-résistance des protozoaires par des lécithines et des cholestérines en solutions colloïdales. Possibilité d'une radio-protection biologique.

La radiothérapie est basée sur les différences de sensibilité des diverses cellules aux rayons X. Chaque cellule présente en effet une susceptibilité propre, due à sa nature histophysiologique ; mais cette susceptibilité peut être modifiée, soit par viciation morphologique et reproductive, comme dans le cancer, soit par action expérimentale ou accidentelle d'un agent capable de perturber les conditions de vie de l'élément considéré, ou le mode d'action des radiations.

Parmi ces agents, on a préconisé la température, l'acidité ionique, le potentiel d'oxydoréduction, l'apport plus ou moins important d'éléments nutritifs, le mode de respiration cellulaire suivant les théories de WARBURG, la proximité des corps étrangers à fort poids atomique, capables d'émettre sous l'influence des rayons X des radiations secondaires puissamment agissantes sur les cellules irradiées.

Mais c'est à l'étude des variations obtenues dans la radio-sensibilité par l'action des substances chimiques n'intervenant pas par le poids atomique que nous nous sommes particulièrement attachés.

Les modifications orientées dans le sens d'une augmentation de la sensibilité ont fait l'objet des travaux de plusieurs expérimentateurs ; mais c'est pour la première fois à notre connaissance que l'on essaie d'obtenir un accroissement de la résistance aux rayons X par un corps de poids atomique faible.

CHOIX DU MATÉRIEL D'EXPÉRIMENTATION.

Les recherches pratiquées sur les cellules indépendantes offrent l'avantage d'éliminer les réactions mutuelles des éléments qui peuvent se produire dans un tissu ou un organe, et par là font appel à un réactif plus facilement contrôlable. Nous avons donc choisi comme objet d'études les Paramécies, protozoaires dont la taille permet l'irradiation d'un nombre important d'individus par un faisceau radiant de faible section, tout en permettant à l'examen microscopique de suivre facilement le mouvement et le changement apparaissant dans le cytoplasme ; enfin le critère de leur mort par radiolésion en milieu nutritif habituel est l'éclatement, la lyse, phénomène caractéristique.

Les radiorésistances individuelles variant légèrement suivant la souche initiale et le milieu de culture, nous avons fait choix du type *Paramecium caudatum* et *Paramecium aurelia* cultivés sur l'extrait de laitue ; les doses léthales sont alors nettement définies et les écarts individuels ne dépassent pas 15 pour 100.

En examinant la résistance des diverses souches des Paramécies de résistances différentes vis-à-vis de l'action des saponines, nous avons constaté que les souches des Paramécies supportant les plus fortes doses de saponine résistaient aussi aux plus fortes doses roentgéniennes.

Les Protozoaires sont extrêmement radiorésistants et la plupart des espèces, comme par exemple les Paramécies, ne subissent aucune modification immédiate ni tardive sous l'influence des doses les plus élevées que l'on ait employées dans ce but avec les tubes à rayons X ordinaires.

L'emploi d'un tube spécial, construit par A. DOGNON, capable de donner un très grand rayonnement, nous a permis au contraire d'obtenir en quelques minutes la mort des Paramécies dans leur milieu normal, et donne ainsi la possibilité d'étudier une lésion cellulaire d'un type particulier, en ce sens qu'il ne s'agit plus ici, comme en général, d'une radiodestruction de l'appareil reproducteur cellulaire, apprécié par la diminution ou les anomalies de la division, mais d'une modification protoplasmique facilement observable au microscope.

TUBE GÉNÉRATEUR.

Pour nos recherches nous avons employé un tube métallique démontable, fonctionnant sur pompe hélicoïdale de HOLWECK ; la paroi du tube est refroidie par une circulation d'eau, ainsi que l'anticathode que nous avons choisie en chrome. La circulation d'eau dans l'intérieur du tube est suffisamment puissante pour éviter l'échauffement de la préparation. Le rayonnement sort par une fenêtre d'aluminium de 15 μ d'épaisseur et 7 mm. de diamètre. La distance anticathode-fenêtre est de 28 mm. seulement et la distance anticathode-préparation irradiée est de 33 mm., ce qui assure au tube un rendement relativement élevé. En effet, sous le régime de 15.000 volts et 15 mA, habituellement employé, on obtient un rendement d'environ 1.200 « r » (internationaux) par seconde. Pour fixer les idées, DOGNON bloquait avec le même appareil dans une seconde le développement d'un œuf d'*Ascaris*, et nous avons pu, en collaboration avec Iwo LOMINSKI, obtenir dans des temps variables entre 30 secondes et 4 minutes la stérilisation de 20 souches bactériennes irradiées en goutte pendante. Le régime de fonctionnement indiqué ci-dessus ne correspond pas au maximum admissible. Grâce à cette intensité relativement grande, qui est environ 1.000 fois plus élevée que celle que l'on obtient par des tubes habituels, il devient possible de réduire les expériences à un temps assez court. Ce grand rendement est surtout utile dans des expériences, où le fait physiologique des rayons X est sous la dépendance de deux facteurs : les quanta d'énergie roentgénienne absorbés par les cellules et le temps nécessaire pour l'adsorption de ces quanta.

CHOIX DES SUBSTANCES ACTIVES.

Dans le choix des substances employées nous avons été guidés par des considérations suivantes :

D'une part, afin d'éviter le rayonnement caractéristique propre nocif, nous n'avons utilisé que des éléments à poids atomique faible.

D'autre part, l'augmentation de la perméabilité des membranes sous l'action des rayons X, signalée par PHILIPSON et MENDELEEF, et le fait que la mort des cellules se manifeste par une lyse, nous

ont conduit à faire appel à des corps jouissant d'un pouvoir antilytique marqué. Deux d'entre eux ont retenu notre attention.

En premier lieu la cholestérine, grâce à laquelle RANSOM, en 1901, avait pu protéger des hématies contre l'action hémolysante de la saponine.

Puis la lécithine, dont les propriétés antilytiques avaient été fort discutées (1) à la suite de travaux faits avec des produits impurs ou dégradés.

PRÉPARATION DES ÉMULSIONS DE LÉCITHINES ET CHOLESTÉRINES.

La solution-mère de cholestérine est préparée de la façon suivante : dans 200 cc. d'eau de source on émulsionne une très petite quantité d'huile d'olive, puis on y ajoute 2 gr. de cholestérine Pouleuc. Dans les expériences ultérieures nous avons remplacé l'huile d'olive par l'huile de pseudo-amandes douces qui permet d'obtenir une émulsion plus fine. Le tout est ensuite brassé avec des billes de verre dans un agitateur mécanique jusqu'à ce que l'émulsion résultante ne floccule plus, ne montre plus de grains visibles dans un microscope habituel et soit couleur de lait.

Pour limiter au minimum le changement du milieu nutritif imposé aux Infusoires par le mélange de leur culture avec la solution-mère, nous sommes parti, dans une autre série d'expériences, d'une émulsion où la phase dispersante était non plus l'eau pure, mais un filtrat sur coton d'une culture témoin ; ainsi était conservée aux Paramécies, lors des dilutions, une flore microbienne qui leur était familière.

Nous avons suivi la même technique pour la préparation des émulsions de lécithines. Une première émulsion fut préparée à partir d'un échantillon de lécithine commerciale (POULEUC) par agitation prolongée en présence d'une petite quantité d'huile d'olive, tandis qu'une autre émulsion était obtenue par agitation d'une durée plus prolongée sans adjonction d'huile, à partir d'un second échantillon de lécithine (MERK). Dans les deux cas on disposa, après agitation prolongée, d'une préparation-mère contenant 1 pour 100 de lécithine par rapport au poids sec.

Les mélanges de cholestérines et de lécithines, moins stables que

(1) NOGUCHI, KYES, ARRHÉNIUS, *l. c.*

les émulsions de chacun de ces produits seuls, furent agités pendant 24 heures dans un agitateur mécanique.

COMPORTEMENT DES PARAMÉCIES EN MILIEU NORMAL.

La mort des Paramécies, irradiés dans une goutte aussi réduite que possible de leur milieu normal et le moindre échauffement étant rigoureusement exclu, survient au bout de 18 à 22 minutes et ceci sous le régime de 15.000 volts et 15 mA.

Le comportement des Paramécies irradiées ressemblait en beaucoup de points à celui des Paramécies exposées à l'action lytique de la saponine. Après quelques minutes d'irradiation, les Paramécies parcouraient le champ microscopique en montrant une grande excitation. Puis survenaient des mouvements non coordonnés ; les Infusoires tournaient très rapidement autour de leur axe, se heurtaient contre de petits obstacles qu'une Paramécie normale sait éviter et changeaient quelque peu leur contour habituel. Vers la période terminale de l'irradiation les Paramécies prenaient peu à peu un aspect vacuolaire, présentaient des hernies volumineuses de la membrane à travers laquelle le cytoplasme s'écoulait en dehors ; enfin elles éclataient comme pulvérisées.

COMPORTEMENT DES PARAMÉCIES

EN MILIEU ADDITIONNÉ DE LÉCITHINE EN SOLUTION COLLOIDALE.

Différentes souches du *Paramecium aurelia*, cultivées sur l'extrait de laitue, ont été employées. Chaque irradiation a été pratiquée dans des petites cuvettes de 1 mm. d'épaisseur, en goutte pendante renfermant au moins 30 individus.

Toute préparation dont la concentration en lécithine colloïdale était supérieure à 1/200^e se montra toxique. Aussi n'en avons-nous utilisé que de plus étendues, nous limitant arbitrairement au taux de 1 pour 250.000.

Après addition de lécithine au milieu de culture des Paramécies, celle-ci gardait un aspect normal. Après quelques jours le milieu, d'abord lactescent, s'éclaircissait ensuite, tandis que les Infusoires prenaient une teinte plus foncée et ralentissaient leurs

mouvements. Après un séjour d'une semaine environ dans le milieu lécithiné les Paramécies reprenaient peu à peu leur transparence et leur mobilité habituelle.

La faible absorption du rayonnement par la lécithine dans la solution, était insuffisante pour apporter des modifications appréciables aux résultats obtenus, qui tous montraient une augmentation de la radio-résistance chez les sujets lécithinés.

Deux facteurs importants nous ont paru conditionner cette augmentation dans nos expériences : 1° La concentration de la lécithine dans le milieu le premier jour après l'addition du phosphatide ; 2° la durée du contact des Paramécies avec la lécithine avant l'irradiation.

En effet, les animaux mis dans une solution contenant de la lécithine à 1/400^e et irradiés immédiatement présentaient, par rapport aux témoins soumis au même rayonnement, une survie de 15 pour 100, alors que la survie atteignait 80 pour 100 si le milieu contenait 1/300^e de lécithine.

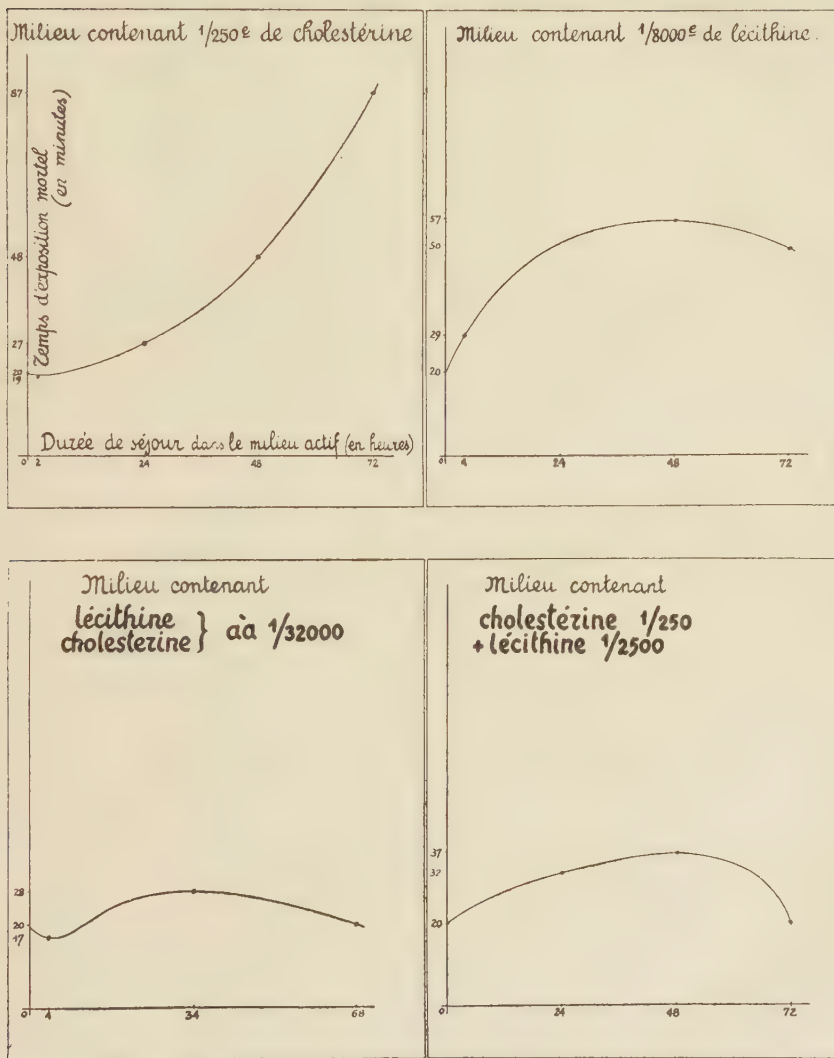
Après trois jours de contact avec une solution lécithinée au 1/600^e les Paramécies ne mouraient qu'après avoir reçu une dose trois fois et demie supérieure à celle nécessaire pour tuer les témoins. La même culture continua à montrer un comportement identique encore pendant 8 jours et il en était de même pour toute autre culture, dont la concentration en lécithine colloïdale restait dans les limites que nous avons choisies (de 1/300^e-1/1.000^e).

Peu à peu la différence de résistance entre les animaux lécithinés et les témoins baissait à mesure que le milieu s'appauvrisait en lécithine et se clarifiait ; après 22 jours les Paramécies lécithinées n'avaient plus que 30 pour 100 de résistance supplémentaire et après 30 jours la résistance des Paramécies cultivées en milieu lécithiné vis-à-vis des rayons X était redevenue normale.

Les Paramécies lécithinées ne montraient qu'une augmentation de la résistance vis-à-vis de l'action des rayons X, mais aussi leur comportement était différent de celui des témoins : elles n'éclataient pas comme les Paramécies normales, mais, au contraire, mouraient en gardant sensiblement leur structure habituelle.

COMPORTEMENT DES PARAMÉCIES DANS UN MILIEU DE CULTURE
ADDITIONNÉ D'UNE ÉMULSION DE LÉCITHINE ; AUGMENTATION DE
LA RADIORÉSISTANCE.

Les Infusoires cultivées dans des milieux de culture lécithinés à
des taux compris entre $1/250^e$ et $1/250.000^e$, ne paraissent nulle-



Résistance maxima des Paramécies cultivées dans des milieux de culture
contenant de la lécithine ou de la cholestérine.

ment incommodées et continuaient leurs mouvements normaux. La culture rendue d'abord lactescente par addition du phosphatide émulsionné, s'éclaircissait progressivement, tandis que les animaux devenaient plus opaques dans des concentrations de lécithine allant jusqu'à 1/10.000^e. Pendant que le milieu s'appauvissait en lécithine, les Paramécies reprenaient peu à peu leur transparence et leur mobilité habituelles.

Soumises à l'action du rayonnement, les Paramécies des préparations ainsi réalisées à partir de la lécithine seule présentaient toujours une radio-résistance supérieure à celle des témoins, radio-résistance pouvant être telle que la quantité d'énergie röntgénienne nécessaire pour déterminer leur mort immédiate fût 4 à 5 fois supérieure à celle utile pour tuer les témoins sous l'action des rayons, et que la dose immédiatement léthale pour ces derniers laissât les animaux préparés indifférents.

Cette radio-résistance maxima se produisait d'ailleurs pour des proportions très faibles des substances actives, ne correspondant pas forcément à la concentration étudiée la plus élevée ; c'est ainsi que dans l'expérience que nous donnons ici à titre d'exemple, elle fut obtenue pour des cultures contenant 1/8.000^e de lécithine émulsionnée.

TABEAU I.

Tubes nos	Pourcentage de lécithine	Durée de séjour des Paramécies dans l'extrait de laitue lécithiné			
		4 h.	24 h.	48 h.	72 h.
1	1/25 ^e	28	22	—	—
2	1/250 ^e	28	—	26	—
3	1/500 ^e	29	45	—	—
4	1/1.000 ^e	29	—	24	—
5	1/2.000 ^e	29	50	—	—
6	1/4.000 ^e	29	—	47	—
7	1/8.000 ^e	29	40	57	50
8	1/16.000 ^e	29	—	34	27
9	1/32.000 ^e	29	35	—	26
10	1/64.000 ^e	28	—	26	25
11	1/125.000 ^e	—	30	26	21
12	1/250.000 ^e	22	—	—	20
	Témoins.....	20	20	20	20

Ces chiffres représentent en minutes, les temps d'exposition aux rayons X amenant la mort immédiate ; les écarts sur la dose léthale dus aux variations individuelles étaient d'environ 15 p. 100.

Le temps de contact des Protozoaires avec la lécithine seule était aussi un facteur important ; la radio-sensibilité diminuait au début pour devenir minima après 2 ou 3 jours, puis reprenait en quelques semaines peu à peu sa valeur habituelle en un temps variable suivant le titre de la solution.

De même qu'avec la lécithine colloïdale les Paramécies lécithinées tuées par l'action des rayons X, conservaient sensiblement leur forme, contrairement aux témoins qui étaient alors entièrement lysés.

Le tableau I représente en minutes le temps d'exposition aux rayons X amenant la mort immédiate. Les Paramécies étaient cultivées sur extrait de laitue, additionné d'une émulsion de lécithine commerciale (POULENC).

COMPORTEMENT DES PARAMÉCIES DANS UN MILIEU DE CULTURE
ADDITIONNÉ D'UNE ÉMULSION DE CHOLESTÉRINE ; AUGMENTA-
TION DE LA RADIO-RÉSISTANCE.

Après avoir préparé une émulsion de cholestérine contenant environ 1/200^e du produit actif sec, nous avons mélangé cette émulsion avec des cultures de *Paramaccium aurelia* cultivées sur extrait de laitue. Dans les différents tubes la solution-mère entraînait respectivement dans la proportion de 4/5^e, 2/5^e, 1/5^e, 1/10^e, 1/20^e, 1/40^e, 1/80^e, 1/160^e, 1/320^e.

La cholestérine ne paraissait pas incommoder les Paramécies qui, dans toutes ces dilutions, continuaient leur évolution normale, sauf dans le tube n° 1, où elles présentaient le premier jour des mouvements incoordonnés.

TABLEAU II.

Proportion de la solution-mère de cholestérine	Durée de séjour des Paramécies dans les milieux cholestérinisés					
	2 heures	1 jour	2 jours	3 jours	7 jours	21 jours
4/5 ^e	17	21	24	46	—	—
2/5 ^e	19	27	48	87	50	44
1/5 ^e	17	25	33	52	43	37
1/10 ^e	23	36	41	65	31	31
1/20 ^e	23	30	42	57	32	24
1/40 ^e	22	26	38	45	—	—
1/80 ^e	—	28	32	46	26	20
1/160 ^e	25	33	40	48	—	—
1/320 ^e	—	24	29	—	—	—
Témoins sans cholestérine ..	20	20	20	20	20	20

Après un séjour dans un milieu cholestériné, les Paramécies semblent se charger de cholestérine jusqu'à un certain taux qui diminue ensuite progressivement, à mesure que le milieu s'appauvrit en cholestérine émulsionnée. La lecture des tableaux montre que, dans nos expériences : 1^o la présence de la cholestérine accroît la résistance des Paramécies vis-à-vis des rayons X ; 2^o l'importance de cet accroissement est particulièrement considérable pour des Paramécies cultivées dans des milieux contenant des proportions moyennes de ce produit ; 3^o pour un même temps de contact des Protozoaires avec la cholestérine la courbe de la résistance supplémentaire est ondulée ; 4^o au moment de leur mort, provoquée par les rayons X, les Protozoaires cholestérinisés subissent une lyse moins marquée que les témoins.

ACTION DES MILIEUX DE CULTURE CONTENANT DES MÉLANGES DE LÉCITHINE ET DE CHOLESTÉRINE SUR LA RADIORÉSISTANCE DES PROTOZOAIRES.

Dans des milieux de culture contenant un mélange de lécithine et de cholestérine, la transparence et l'activité des Paramécies restaient à peu près normales. Alors que la lécithine seule ou la cholestérine seule conféraient aux Paramécies une augmentation notable de la radiorésistance aux rayons X, le mélange des deux avait, dans les circonstances les plus favorables, une action beaucoup moins marquée et moins durable que celle de chacun des constituants ; de plus, les mélanges à parties égales accroissaient le premier jour la radiosensibilité pour des dilutions allant jusqu'à 1/32.000^e de chacune des substances, dilutions telles que la somme de leurs toxicités propres paraît insuffisante à expliquer la sensibilisation. Enfin, lors de leur mort, due aux rayons X, les Paramécies présentaient une lyse aussi marquée que celle des témoins (*Voy. tabl. II et III*).

Ces expériences indiquent que la lécithine et la cholestérine, présentes dans chaque cellule vivante à des taux et des états colloïdaux variables, doivent être un des facteurs qui conditionnent la radiorésistance des éléments vivants aux rayons X ; il nous semble qu'il serait intéressant de rechercher si l'imprégnation expérimentale de certaines cellules par ces corps peut créer, entre elles et leurs

TARLEAU III.

Tubes nos	Pourcentage de		Durée de séjour des Paramécies dans le milieu cholestéroliné et lécithiné		
	cholestéroline	lécithine colloïdale	24 h.	48 h.	72 h.
1	1/125 ^e	1/1.250 ^e	39	47	42
2	1/250 ^e	1/2.500 ^e	32	37	20
3	1/500 ^e	1/5.000 ^e	33	34	20
4	1/1.000 ^e	1/10.000 ^e	34	32	20
5	1/2.000 ^e	1/20.000 ^e	34	27	20
6	1/4.000 ^e	1/40.000 ^e	32	22	20
7	1/8.000 ^e	1/80.000 ^e	33	25	20
8	1/16.000 ^e	1/160.000 ^e	33	22	20
9	1/32.000 ^e	1/320.000 ^e	33	20	20
10	1/64.000 ^e	1/640.000 ^e	33	20	20
11	1/125.000 ^e	1/1.250.000 ^e	—	21	20
	Témoins		20	20	20

voisines de susceptibilités identiques ou peu différentes, un écart de radorésistance tel que l'irradiation, mortelle pour ces dernières, soit sans effet appréciable sur les premières, réalisant ainsi pour elles une radioprotection biologique.

CHAPITRE IX

Rayons X et hémolyse *in vitro*.

Victor HENRI et A. MEYER (1) exposant des globules rouges à l'action des rayons du radium constatèrent que les cellules ainsi traitées présentaient une diminution de leur résistance à l'hémolyse hypotonique par rapport aux témoins.

Vingt années plus tard HOLTHUSEN (2) expérimentant sur des hématies incluses dans l'agar-agar, obtenait par irradiation d'une heure à l'aide des rayons X pénétrants émis par une ampoule de radiothérapie courante une altération telle que 24 heures après l'exposition aux rayons de Roentgen débutait une lyse tardive qui devenait totale en 48 heures, tandis que de la méthémoglobine se formait aux dépens de l'hémoglobine.

Il avait ainsi gagné sur ses prédécesseurs dans la réalisation de la radiohémolyse, mais encore ne l'obtenait-il que retardée, et de plus l'agar-agar qu'il utilisait comme support pour les hématies était un élément frénateur.

Nous avons repris la question en nous proposant d'observer directement la lyse à la fin d'une irradiation dont la durée serait de l'ordre de la demi-heure, tout en suivant pas à pas sa progression.

Pour faire absorber aux hématies en un temps aussi court la dose considérable d'énergie roentgénienne qui se montrait nécessaire à leur lyse immédiate, nous avons utilisé le rayonnement du chrome émis par un tube démontable, dont l'anticathode et la partie métallique des parois était refroidie par une circulation d'eau, ce qui évitait l'échauffement de la préparation qui, grâce aux faibles dimensions du tube, pouvait être placée à 27 mm. de l'anticathode. Le rayonnement sortait par une fenêtre de 7 mm. de diamètre et à

(1) HENRI (V.) et MEYER (A.), *C. R. Soc. de Biol.*, 55 p., 1414, 1903.

(2) HOLTHUSEN, *Strahlentherapie*, 14, p. 561, 1923.

travers une lame d'aluminium de 15 μ . Un courant de 20 mA traversait le tube sous une tension de 16.500 volts.

Aussi bien le sang complet que le sang lavé et dilué peuvent être lysés par une dose roentgénienne suffisamment élevée ; le sang complet résiste mieux à l'action lytique des rayons X. Cette résistance relativement élevée du sang complet est explicable par le pouvoir antilytique du sérum, et le même phénomène se répète dans l'action lytique des saponines, où l'on constate également que le sang dilué et lavé est plus facilement lysé.

Nous donnons ici les résultats de quelques expériences qui ont été faites avec du sang défibriné et dilué au 1/200^e dans de l'eau salée à 8 pour 1.000 ; nous nous sommes aperçus, d'ailleurs, que la teneur de l'eau en *NaCl* faisait varier notablement la résistance des hématies vis-à-vis de l'action lytique des rayons.

Avec les caractéristiques indiquées, le sang d'homme adulte irradié en minces gouttes pendantes de 1 mm. d'épaisseur était complètement lysé en 23 minutes, alors que 14 minutes seulement suffisaient pour produire les mêmes effets avec les hématies de cobaye mâle.

Pour préciser nos mesures, nous avons placé ultérieurement le sang étudié dans une cellule hématométrique de Thoma, légèrement modifiée. L'anneau circulaire était d'un volume environ 5 fois plus petit, pour éviter l'évaporation qui se produisait pendant l'irradiation. La goutte de sang était couverte avec des lamelles couvre-objets en verre de 100 μ d'épaisseur. Les lamelles fabriquées en série avaient une épaisseur rigoureusement identique. La préparation était ensuite scellée à la paraffine et l'hématomètre était alors retourné sur la fenêtre du tube et les hématies recevaient le rayonnement à travers la lamelle, qui absorbait 70 pour 100 du rayonnement. La durée de l'exposition aux rayons se trouvait de ce fait sensiblement doublée, puisque d'une part, la lamelle absorbait une partie importante du rayonnement et d'autre part la couche d'eau, dans laquelle les hématies étaient suspendues, n'avait que 1/10^e d'épaisseur.

Cette technique nous a permis d'éviter l'évaporation qui, consécutivement à la concentration en *NaCl*, aurait augmenté la résistance des hématies, et nous a donné ainsi la possibilité de pratiquer à volonté la numération et de suivre l'évolution du phénomène lytique dans le temps.

Au cours de l'irradiation on constatait macroscopiquement une tendance au noircissement du sang irradié non dilué, par formation de méthémoglobine ; microscopiquement les hématies du sang dilué à 1/200^e se détachaient d'abord franchement dans le champ optique ; mais elles ne tardaient pas à perdre tout contraste avec le fond de la préparation, à un tel point qu'on ne pouvait plus les en distinguer. Le moment auquel se faisait cette transformation n'était pas le même pour tous les globules et il était possible de calculer à chaque instant le taux des hématies ayant perdu leur hémoglobine et d'apprécier les radiorésistances partielles.

Nous rapportons dans le tableau ci-après quelques-uns des résultats observés chez différentes espèces animales ; la température du laboratoire s'était maintenue au cours de toutes les expériences aux environ de 30°.

SANG DILUÉ 200 FOIS. 20 MA. 16.500 VOLTS.

Degré de lyse en pour 100 après (en minutes).

	10	15	20	25	30	35	40	45	50
I. Sang d'Homme :									
40 ans.....				24		44		97	100
39 ans.....			26		38			90	100
29 ans.....			3		13		86	100	
29 ans.....			4		16		70		100
II. Sang de Femme :									
35 ans.....			18			76	100		
22 ans.....		10	17	30	35	77	85	100	
21 ans.....		26		44	100				
III. Sang du Cobaye mâle :									
300gr.		48		93	100				
300 gr.	10		86	100					
300 gr.		63		100					
300 gr.		40	60	84	100				
800 gr.	8		70	92	100				
IV. Sang du Cobaye femelle :									
800 gr.	65	100							
800 gr.	16	39	83	100					
500 gr.	48	100							
500 gr.		38							
500 gr.	25	36	65	100					

Outre les variations des radiorésistances dues aux différentes espèces, il existe dans chacune d'elles des divergences individuelles marquées :

L'âge et le sexe y ont leur part, mais il est possible que les troubles morbides puissent avoir également un rôle perturbateur important.

Nous avons remarqué par exemple que les cobayes qu'on avait gardé pendant 24 heures dans un endroit très froid accusaient une lyse plus prononcée par les rayons X.

A titre comparatif, nous avons tué dans les conditions identiques une population de *Paramaecium aurelia* en douze minutes et des nombreuses souches microbiennes en moins d'une minute.

CHAPITRE X

Détermination de la dose hémolysante des rayons X en unités « r » internationales à l'aide d'une chambre d'ionisation à mesures absolues.

En continuant nos recherches sur l'action des rayons X sur le sang nous avons déterminé la dose hémolytique en unités « r » dans différentes conditions expérimentales.

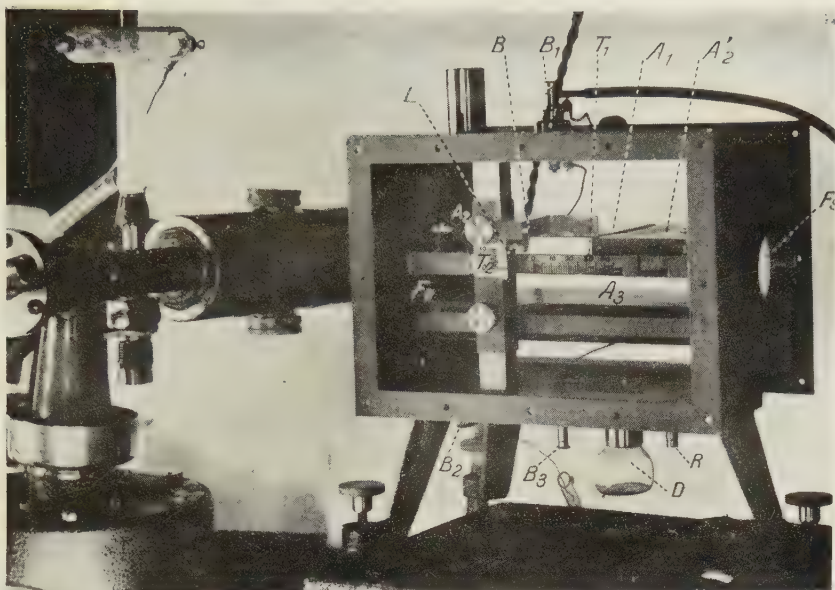
Pour une intensité de 850 « r » par seconde en particulier l'hémolyse totale survient après 25 minutes d'irradiation, ce qui correspond à 1.200.000 « r » (à moins de 10 pour 100 près).

On s'est servi du rayonnement non filtré d'un tube à anticathode cuivre munie d'une fenêtre de 10 μ d'épaisseur et de 8 mm. de diamètre, et fonctionnant sous 27 kV avec 25 mA. La préparation était placée à une distance de 42 mm. du foyer. On met d'autre part en évidence un phénomène qui consiste en ce que la suspension des hématies soustrait l'action du rayonnement après y avoir été soumise pendant un certain temps, continue à lyser avec un rythme d'autant plus accéléré que la dose administrée au début se rapprochait davantage de la dose hémolysante.

Le sang, provenant de plusieurs sujets normaux mâles âgés de 30 ans environ, était défibriné et dilué à 5 pour 1.000. Une goutte de sang était déposée dans une cellule hématométrique de Thoma, légèrement modifiée ; la cellule était entièrement remplie et recouverte d'une lamelle en verre de 1/10^e de mm. d'épaisseur, et scellée à la paraffine pour éviter toute évaporation.

L'hématomètre était ensuite placé dans une position horizontale, la lamelle de verre tournée vers le bas, contre la fenêtre du tube, le rayonnement étant dirigé de bas en haut.

La courbe des globules hémolysés en fonction de la dose a été éta-



La figure reproduit une vue photographique d'un tube à Rayons X, employé dans nos expériences, et de la chambre d'ionisation de ROGOZINSKI.

On a enlevé les deux parois latérales de la chambre dans le but de rendre visible sa disposition intérieure.

(A_1) représente l'électrode de mesure ; (A_2) et (A'_2) les électrodes de garde dont la première est fixe et la seconde mobile ; (A_3), l'électrode de tension, parallèle à l'ensemble (A_2), (A_1), (A'_2) ; (F_e) et (F_s), les fenêtres d'entrée et de sortie ; (D), le récipient à desséchant ; (L), une pièce en laiton à laquelle est fixée, par l'intermédiaire d'un bras en ambre (B), l'électrode (A_1) et grâce à laquelle il est possible d'imprimer à (A_1) un mouvement de translation dans une direction perpendiculaire au plan des électrodes (A_2) (A'_2) ; (B_1) et (B_3), les bornes de sortie respectives des électrodes (A_1) et (A_3), auxquelles elles sont reliées, chacune, par un fil souple, visible sur la figure ; elles sont isolées : la première par un bouchon en ambre, la seconde par un bouchon en ébonite : (B_2) une borne à terre ; (R) un robinet.

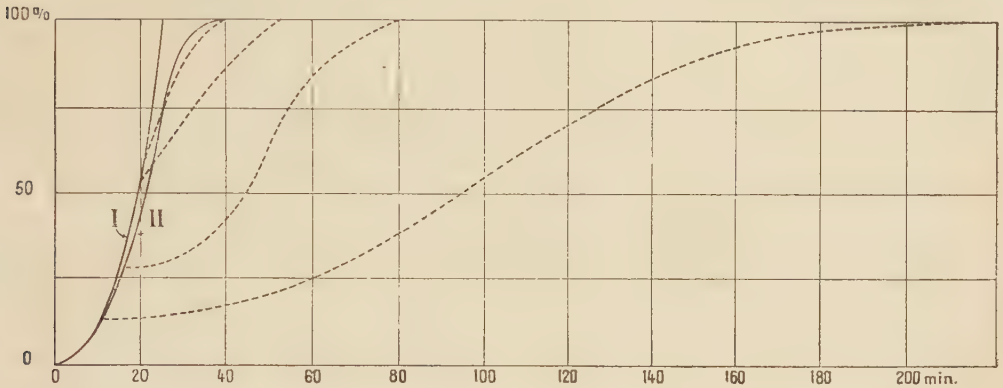
(A_2) et (A'_2) sont fixées à des tubes en laiton à section carrée et peuvent coulisser sur un autre tube gradué (T_1) également en laiton. (A_1) est pourvue, en outre, d'un vernier, de manière que la distance qui sépare (A_2) de (A'_2) puisse être évaluée à 0,1 mm. près.

L'ensemble des électrodes (A_2), (A_1) et (A'_2) ainsi que (A_3) sont portées par une tige graduée (T_2) perpendiculaire à leur plan, le long de laquelle elles peuvent se déplacer, ce qui permet de régler l'écartement entre le premier groupe d'électrodes et (A_3). Grâce à ce dispositif, on peut étendre l'emploi de la chambre à des rayonnements plus durs qui donnent naissance à des photo-électrons de parcours plus long que celui des rayons mous.

blie en faisant à des intervalles plus ou moins rapprochés des énumérations des hématies qui demeuraient visibles dans le champ du microscope.

Les mesures absolues s'effectuaient à l'aide d'une chambre de ionisation de ROGOZINSKI spécialement étudiée pour le rayonnement mou.

On a trouvé que le tube à rayons X donnait 2.500 « r » par seconde au niveau de la fenêtre. Mais la lamelle de verre ne laissant passer qu'environ 30 pour 100 du rayonnement, la suspension recevait ainsi 850 « r » par seconde environ.



Ajoutons que la profondeur de la cellule hématométrique n'étant que 0,1 mm. et que d'autre part les hématies se déposaient au voisinage immédiat de la lamelle, aucun compte n'était tenu de l'absorption du rayonnement par le liquide.

Comptant les hématies qui demeuraient visibles dans le champ du microscope, on a porté en abscisses la durée de l'irradiation et en ordonnées le pourcentage des hématies lysées. La courbe I est celle du sang irradié sans interruption jusqu'à l'hémolyse complète. Elle est établie en soumettant successivement différents échantillons du même sang à des irradiations de durée croissante de 5 jusqu'à 26 minutes.

La courbe II est celle d'un échantillon du même sang, irradié jusqu'à l'hémolyse complète, mais avec des interruptions juste nécessaires pour effectuer la numération des hématies. Ces interruptions ont pour effet : 1° de modifier l'allure de la courbe d'hémolyse et 2° d'accroître sensiblement la dose hémolytique. Les courbes en traits interrompus donnent l'évolution de la lyse amorcée à partir des irradiations initiales variables.

Notons également que, si l'on irradie une petite partie centrale de la préparation, le reste étant protégé contre le rayonnement par un écran en plomb, on constate que l'hémolyse se fait uniquement dans la partie exposée au rayonnement ; cette partie apparaît nettement séparée du reste de la préparation demeurée intacte ; mais après un délai de 12 à 24 heures, la partie de la préparation qui a été protégée contre le rayonnement est aussi graduellement lysée.

La forme des courbes obtenues et plus particulièrement le phénomène de la lyse amorcée, semblent révéler l'intervention de certaines substances lytiques ou antilytiques qui se forment sous l'action du rayonnement responsable des phénomènes observés. Ces substances feront l'objet d'études complémentaires.

CHAPITRE XI

Variations observées à la suite d'injections sous-cutanées de lécithine colloïdale chez le cobaye, dans la radio-résistance de ses hématies *in vitro*.

Ayant montré qu'un milieu de culture contenant de la lécithine augmentait la radiorésistance des Protozoaires, nous avons cherché quel serait le comportement des hématies de mammifères après injections sous-cutanées de lécithine colloïdale.

La lécithine employée était une ovo-lécithine, préparée récemment à l'abri de l'air et contenant 10 pour 100 de produit sec, 8 pour 100 de glycérine et 82 pour 100 d'eau physiologique.

L'appareil à rayons X permettait l'application de fortes doses röntgésiennes tout en évitant l'échauffement de la préparation qui était placée à 28 mm. de l'anticathode en chrome. Le régime de travail était de 20 mA sous 16.500 volts.

Le sang défibriné et dilué au 1/200^e était placé dans un hématimètre de Thoma fermé par une lamelle de 100 μ ; il recevait le rayonnement à travers une fenêtre de 7 mm. de diamètre, obturée par une feuille d'aluminium de 15 μ . Afin d'éviter les vibrations dues au fonctionnement de la pompe moléculaire, la cellule hématimétrique était portée par un statif isolé mécaniquement.

Sur 20 cobayes mâles témoins observés, pesant en moyenne 400 gr., nous avons trouvé que le temps de pose nécessaire pour obtenir la lyse complète n'était jamais inférieur à 21 minutes et jamais supérieur à 30 minutes, avec une moyenne de 25 minutes. Au contraire, chez de nombreux cobayes injectés avec des doses décroissantes de 3 cc. à 0,025 cc. de la solution de lécithine colloïdale, l'irradiation la plus courte amenant la lyse était de 9 minutes et la plus longue dépassait nettement 2 heures; en particulier, 3 jours après une injection de 1,5 cc., les hématies du cobaye 32 ne

présentaient, le lendemain d'une irradiation de 2 heures, aucune lyse supplémentaire. Les doses inférieures à 0,2 cc. se sont montrées sans action notable.

Nous résumons dans un tableau les résultats principaux d'une série d'expériences. Une étude graphique des divers cas observés nous conduit à penser que l'allure de la courbe des doses donnant l'hémolyse totale, après une première injection ayant une action

TAUX DE LYSE (en pour 100).

	Durée d'irradiation (en minutes)						
	10	20	30	40	50	60	100
<i>Cobaye 31.</i>							
Avant l'injection de 3 cm ³	17	43	100	—	—	—	—
1 heure après l'injection	—	—	—	70	81	100	—
1 jour après l'injection	—	—	—	—	—	17	26
3 »	—	98	—	—	—	—	—
4 »	—	40	100	—	—	—	—
Réinjection de 3 cm ³							
1 heure après l'injection	—	100	—	—	—	—	—
2 jours après l'injection	100	—	—	—	—	—	—
4 »	—	50	65	100	—	—	—
5 »	—	20	80	98	—	—	—
6 »	26	54	100	—	—	—	—
<i>Cobaye 32.</i>							
Avant l'injection de 1 cm ³ 5	—	—	100	—	—	—	—
1 jour après l'injection	—	10	—	—	—	—	17
2 »	—	11	—	—	—	—	17
3 »	—	—	—	—	—	—	15
5 »	—	—	—	—	—	—	25
6 »	—	—	—	—	—	25	27
7 »	—	15	36	60	65	70	72
8 »	—	12	27	—	—	68	75
9 »	—	18	69	100	—	—	—
<i>Cobaye 33.</i>							
Avant l'injection de 0 cm ³ 75	—	35	100	—	—	—	—
20 heures après l'injection	—	20	75	90	100	—	—
26 »	100	—	—	—	—	—	—
3 jours après l'injection	70	100	—	—	—	—	—
5 »	50	68	70	70	—	100	—
6 »	45	100	—	—	—	—	—
7 »	60	100	—	—	—	—	—
<i>Cobaye 34.</i>							
Avant l'injection de 0 cm ³ 4	—	73	100	—	—	—	—
2 heures après l'injection	13	100	—	—	—	—	—
2 jours après l'injection	24	100	—	—	—	—	—
4 »	15	41	80	100	—	—	—
5 »	16	—	98	—	—	—	—
6 »	—	70	100	—	—	—	—

décelable dans nos conditions de travail, est sous la dépendance de deux facteurs : l'un fournissant une augmentation de la radio-résistance, à maximum vers la fin du quatrième jour et souvent précédée d'une période de sensibilisation ; l'autre, accroissant la radio-résistance dès les premiers instants, et dont l'intensité et la durée sont fonctions de l'importance globale de l'injection.

CHAPITRE XII

Radiohémolyse et Cholestérine.

Les cobayes ayant reçu des injections d'une lécithine colloïdale ont présenté une augmentation de leurs résistances à la radiohémolyse *in vitro*. Nous avons donc essayé de reproduire le même phénomène à l'aide de la cholestérine, introduite soit par injection, soit par ingestion.

Suivant notre technique habituelle, une goutte de sang a été prélevée par piqûre de l'oreille, défibrinée et diluée 200 fois dans l'eau salée à 8 pour 1.000. Une goutte de ce liquide a été déposée dans une cellule hématométrique de Thoma en quartz, et recouverte d'une lamelle de 100 μ d'épaisseur. La cellule était scellée à la paraffine, afin d'éviter toute évaporation. Ensuite l'hématomètre a été exposé au rayonnement non filtré d'un tube à anticathode en chrome, muni d'une fenêtre en aluminium de 15 μ . d'épaisseur et de 7 mm. de diamètre et fonctionnant sous 21 kV, avec 20 mA. La disparition optique des hématies dans le champ du microscope a été considérée comme test de l'hémolyse. Après chaque expérience l'hématomètre a été nettoyé à l'acide sulfochromique et à l'eau distillée.

Suivant le mode de préparation des solutions utilisées, nous avons eu, pour une même quantité de cholestérine injectée, des résultats très variables. En injectant 5 cc. d'une suspension de cholestérine à 1 pour 100 dans l'eau salée, l'action était presque nulle. Au contraire, en injectant la même dose plus finement dispersée par présence d'huile d'olive ou par agitation prolongée, l'effet était immédiat, et une demi-heure après l'injection le temps nécessaire pour obtenir la lyse était triplé ; mais dès le lendemain la radiorésistance était redevenue normale.

Des préparations huileuses nous ont donné, non seulement une augmentation de la radiorésistance, mais encore une persistance notable de celle-ci pouvant atteindre 3 semaines à la suite d'une

seule injection après un établissement plus lent. Donnons, à titre d'exemple, les résultats d'une expérience.

1^o Cobaye de 315 gr. Temps de lyse avant l'injection 25 minutes ; injection intramusculaire de 3 cc. d'huile d'olive à 4 pour 100 de cholestérine dans les membres inférieurs.

Temps de lyse après 24 heures, 25 minutes ; après 2 jours, 50 minutes. A partir du troisième jour jusqu'au 12^e jour, 55 minutes, puis retour lent à la résistance normale atteinte le 18^e jour.

2^o Cobaye de 360 gr. Temps de lyse avant l'injection 30 minutes ; injection de 3 cc. d'huile d'olive à 3 pour 100 de cholestérine : augmentation de la résistance vis-à-vis de l'action hémolytique des rayons pendant 11 jours.

L'administration de l'huile cholestérinée *per os* permet également de doubler la radiorésistance des hématies. Voici les résultats d'une expérience :

Cobaye de 900 gr. Temps de lyse pour le cobaye neuf : 30 min. ; ingestion 3 jours consécutifs de 5 cc. d'huile d'olive à 4 pour 100 de cholestérine. Dès le 3^e jour la dose lytique n'est obtenue qu'au bout de 45 min. d'exposition aux rayons. La résistance maxima se manifeste au 5^e jour, où le sang est seulement lysé après 68 min. d'exposition. La décroissance de la résistance s'effectue progressivement jusqu'au 15^e jour, où elle est redevenue normale.

Ajoutons encore que les hématies d'un groupe de cobayes témoins, observées pendant un temps prolongé, présentaient une radiorésistance constante, même après administration d'huile d'olive pure.

CONCLUSIONS

I. — CYTOLYSE (*agents chimiques*).

a) Les mélanges de saponine et de lécithine ont une action cytolytique moins prononcée que la saponine seule.

b) L'inhibition de l'action cytolytique des mélanges de saponine et lécithine, et saponine et cholestérine, est plus prononcée dans des conditions d'aération restreinte.

c) Les protozoaires cultivés dans des milieux de culture contenant de la lécithine ou de la cholestérine montrent une diminution de leur perméabilité vis-à-vis des colorants vitaux.

II. — BACTÉRIOLYSE.

La lyse transmissible des microbes par le bactériophage est inhibée en présence des petites doses de lécithine ou de cholestérine.

III. — HÉMOLYSE (*agents chimiques*).

a) Les doses importantes de lécithine peuvent inhiber ou retarder jusqu'à 1.000 fois l'action hémolytique de la saponine.

b) Le pouvoir hémolysant de la lécithine passe par un maximum pour une concentration donnée.

c) Un facteur hémolytique de la lécithine, se formant soit spontanément à la présence de l'air, soit plus prononcé par des petites doses de saponine, est mis en évidence.

d) Cette augmentation du pouvoir hémolytique de la lécithine par de très petites doses d'un corps lytique (saponine) permet d'établir une réaction décelant de très petites quantités de saponine ($1/750.000.000^e$).

IV. — CYTOLYSE (*agents physiques*).

Les protozoaires cultivés dans des milieux de culture contenant soit de la lécithine, soit de la cholestérine, voient leur résistance à l'action lytique des rayons X sensiblement augmentée. Les mélanges des deux substances ont, dans les circonstances les plus favorables, une action beaucoup moins marquée et moins durable que chacun des constituants, et qui peut être sensibilisante, même à certaines concentrations si faibles que la somme de leurs toxicités propres paraît insuffisante à l'expliquer.

V. — HÉMOLYSE (*agents physiques*).

a) Avec un appareil à rayons X débitant 2.000 unités roëntgésiennes par seconde, on obtient la lyse des hématies de mammifères. Une technique est élaborée qui permet de suivre ce phénomène dans le temps.

b) 1.200.000 unités roëntgésiennes sont nécessaires pour obtenir la lyse complète du sang humain.

c) L'injection ou l'ingestion de solutions des lipoïdes augmente dans des fortes proportions la radiorésistance des mammifères.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
L'influence des lécithines sur l'action cytolysante des saponines.....	1
L'influence de l'oxygène sur les sapo-lécithines.....	9
L'influence de l'oxygène sur l'action antitoxique de la cholestérine sur les saponines.....	14
L'action de la lécithine et de la cholestérine en solutions colloïdales sur la coloration vitale.....	18
Recherches comparées de quelques échantillons de phyto- et ovo-lécithines:	
I. — Leur action sur l'hémolyse.....	21
II. — L'action hémolytique des lécithines.....	24
III. — Inhibition de l'action hémolysante d'une ovo-lécithine par la saponine.....	26
IV. — Etude de l'action hémolysante d'un complexe saponine-phyto-lécithine.....	28
V. — Etude de l'action hémolysante d'un complexe saponine-ovolécithine.....	31
VI. — Description d'une réaction permettant de déceler de très petites quantités d'un facteur lytique (Saponine).....	34
Influence de la lécithine colloïdale sur le phénomène de la lyse microbienne par le bactériophage.....	45
Inhibition et affaiblissement de la lyse microbienne transmissible en présence de diverses lécithines.....	48
Augmentation de la radio-résistance des protozoaires par des lécithines et des cholestérines en solutions colloïdales. Possibilité d'une radio-protection biologique.....	57
Rayons X et hémolyse <i>in vitro</i>	68
Détermination de la dose hémolysante des rayons X en unités « r » internationales à l'aide d'une chambre d'ionisation à mesures absolues.....	72
Variations observées à la suite d'injections sous-cutanées de lécithine colloïdale chez le cobaye, dans la radio-résistance de ses hématies <i>in vitro</i>	75
Radiohémolyse et cholestérine.....	78

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Peau et Poils des Mammifères.

Vu et approuvé :

Paris, le 8 juin 1936.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

